Aus der Abteilung für Nuklearmedizin
der Universität Würzburg
Leiter: Professor Dr.med. W. Börner

PRÜFUNG EINER ENZYMATISCHEN METHODE ZUR THYROXINBESTIMMUNG

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Hans-Werner Weidmann
aus Offenbach/Main

Würzburg, den 14. November 1980

Aus der Abteilung für Nuklearmedizin
der Universität Würzburg
Leiter: Professor Dr.med. W. Börner

PRÜFUNG EINER ENZYMATISCHEN METHODE ZUR THYROXINBESTIMMUNG

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Hans-Werner Weidmann
aus Offenbach/Main

Würzburg, den 14. November 1980

Referent: Professor Dr.med. Wilhelm Börner

Korreferent: Professor Dr.med. Hans Franke

Dekan: Professor Dr.med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. METHODEN DER THYROXINBESTIMMUNG 3

2.1 Der Radio-Immuno-Assay (RIA) 3
2.2 Die kompetitive Eiweißbindungsanalyse (CPBA) 3
2.3 Der Enzym-Immuno-Assay (EIA) 5

3. METHODIK DES MERCKOTEST®-EMIT®-TFG 7

3.1 Reagenzien und Lagerung 7
3.2 Prinzip der automatischen Bestimmung 8
3.3 Testablauf 10
3.4 Standardkurve 11

4. ERGEBNISSE DER METHODISCHEN PRÜFUNG 14

4.1 Durchführung der Versuche und Statistik 14
4.2 Voruntersuchung zur Präzision und Richtigkeit der Methode beim EIA 16
4.1.1 Prüfung des Probe-Reagenz-Dosierers 16
4.2.2 Differenzen zwischen den Chargen 17
4.2.3 Präzision der Standards 18
4.3 Präzision und Richtigkeit von EIA und CPBA 18
4.3.1 Intra-Assay-Varianz 18
4.3.2 Inter-Assay-Varianz 21
4.3.3 Richtigkeit 23
4.4 Einfluß der Lagertemperatur 25
4.5 Testdauer, Handhabung und Kosten 27

Seite

5. ERGEBNISSE DER KLINISCHEN PRÜFUNG 29

5.1 Untersuchungsgut 29
5.2 Vergleich der Mittelwerte 30
5.3 Diagnostische Treffsicherheit 30
5.4 Korrelation 34
5.5 Bestimmung bei hohem und niedrigem T_4-Gehalt 36

6. DISKUSSION 37

6.1 Methodik der Tests 37
6.2 Lagerfähigkeit 39
6.3 Störfaktoren 40
6.4 Automatisierung des EIA 41
6.5 Zuverlässigkeit der Standardkurve 42
6.6 Präzision und Korrelation von EIA und CPBA 43
6.7 Diagnostische Treffsicherheit und Normbereiche 46

7. ZUSAMMENFASSUNG 48

LITERATURVERZEICHNIS I - VI

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ANS	Anilin-Naphtalin-Sulfonsäure
CPBA	Competitive Protein Binding Analysis
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ELISA	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (heterogener Enzym-Immuno-Assay)
EMIT®	Enzym-multiplied-Immunoassay-Technique (homogener Enzym-Immuno-Assay)
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
RIA	Radio-Immuno-Assay
T_3	Trijodthyronin
T_4	Thyroxin
TBG	Thyroxin Binding Globulin

n	Fallzahl
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
$\tilde{x}$	Median
s	Standardabweichung
$s_{\bar{x}}$	mittlerer Fehler des Mittelwertes
$VK\ (\%) = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$	Variationskoeffizient
r	Korrelationskoeffizient
P	Irrtumswahrscheinlichkeit

1. EINLEITUNG

Auf dem Gebiet der Schilddrüsendiagnostik besitzt die In-vitro-Bestimmung der Gesamtthyroxinkonzentration im Serum eine erhebliche Bedeutung. Seit 1963 kann dieser Parameter der Schilddrüsenfunktion mit der von MURPHY u. Mitarbeiter (25, 26, 27) entwickelten kompetitiven Proteinbindungsanalyse (CPBA) erfaßt werden. Bei dieser Methode konkurriert radioaktiv markiertes Thyroxin mit endogenem Serumthyroxin um die Bindungsvalenzen am Trägerprotein. Als Markierungsisotop wurde von NAKAJIMA u. Mitarbeiter zum ersten Mal J-125 für den Test verwendet.

Auf die Arbeiten von YALOW u. BERSON (48) über radioimmunologische Verfahren aufbauend, wurde 1972 ein Radio-Immuno-Assay (RIA) (9, 24) für Thyroxin entwickelt. Dieses Verfahren arbeitet mit Immunkomplexen gegen Thyroxin.

Um das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen zu vermeiden, entwickelte man weitere Testverfahren:

- den Spin-Immuno-Assay (19), bei dem freie chemische Radikale zur Markierung dienen,
- den Viro-Immuno-Assay (14), der zur Markierung Bakteriophagen verwendet,
- den Fluoro-Immuno-Assay (1), mit Fluorophoren als Markierungs-Substanz.

Als einziges dieser Verfahren gewann aber der 1971 von ENGVALL u. PERLMANN (11) zum ersten Mal beschriebene Enzym-Immuno-Assay (EIA) - im Zusammenhang mit der Ig-G-Bestimmung - zunehmend an Bedeutung. Im gleichen Jahr publizierten AVRAMEAS (2) und van WEEMAN (46) weitere Ergebnisse mit dieser Methode. Der von ihnen entwickelte

EIA ist heterogen (ELISA: Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay): Nach der Antigen-Antikörper-Bindung muß eine Trennung des freien vom gebundenen Antigen vorgenommen werden.

1972 wurde von RUBENSTEIN u. Mitarbeiter (34) vom Forschungsinstitut der Firma Syva der EIA modifiziert. Es wurde ein homogener EIA entwickelt (EMIT®: Enzym-multiplied-Immunoassay-Technique), der keines Trennungsschrittes mehr bedarf. Bei dieser Technik wird durch die Bindung der Antikörper an das Antigen eine Änderung der Enzymaktivität erreicht, die photometrisch erfaßt wird. Mit dieser Methode läßt sich eine quantitative Bestimmung für eine Vielzahl von Stoffen durchführen (43).

In der Abteilung für Nuklearmedizin der Universität Würzburg wird seit Jahren mit dem RIA und der CPBA in der Schilddrüsendiagnostik zur Bestimmung des Gesamt-Thyroxins im Serum gearbeitet (16, 35, 36, 45). Es war daher von Interesse, einen Vergleich des T_4-EIA mit einer T_4-CPBA vorzunehmen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der methodischen und klinischen Prüfung des Merckotests®-EMIT®-tfg von Merck im Vergleich zum Tetralute®-Test von Miles-Ames.

2. METHODEN DER THYROXINBESTIMMUNG

Hier soll das Prinzip der heute üblichen Methoden zur Bestimmung des Gesamtthyroxins im Serum kurz erklärt werden.

2.1 Der Radio-Immuno-Assay (RIA)

Voraussetzung für den RIA ist die Möglichkeit der In-vitro-Markierung des Thyroxins mit einem radioaktiven Jodisotop. Bei diesem Verfahren wird durch Zusatz von Anilin-Naphtalin-Sulfonsäure (ANS) zum Patientenserum die Proteinbindung des Thyroxins gelöst. Sodann wird das Serum mit radioaktiv markiertem Thyroxin und einem Thyroxin-Antikörper gemischt und inkubiert. Dieser Antikörper wird durch Immunisierung von Tieren mit einem Thyroxin-Eiweiß-Komplex gewonnen. Bei der Methode konkurrieren Serumthyroxin und radioaktiv markiertes Thyroxin um die Bindungsstellen an einem spezifischen Antikörper.

Die Messung der an den Antikörper gebundenen bzw. der freien Aktivität erfolgt mit einem Zählgerät für Gammastrahlen. Anhand einer Standardkurve, die mit bekannten T_4-Konzentrationen erstellt wird, bestimmt man quantitativ die T_4-Konzentration im Serum.

2.2 Die kompetitive Eiweißbindungsanalyse (CPBA)

Die Methodik beruht auf dem Prinzip der konkurrierenden Proteinbindungsanalyse (Abb. 1). Hierzu wird zunächst das im Serum vorliegende Thyroxin im alkalischen Milieu oder durch organische Lösungsmittel von seinen Bindungsproteinen abgetrennt. Das extrahierte T_4, zusammen mit zugesetztem J-125-markiertem T_4, wird sodann mit einer definierten

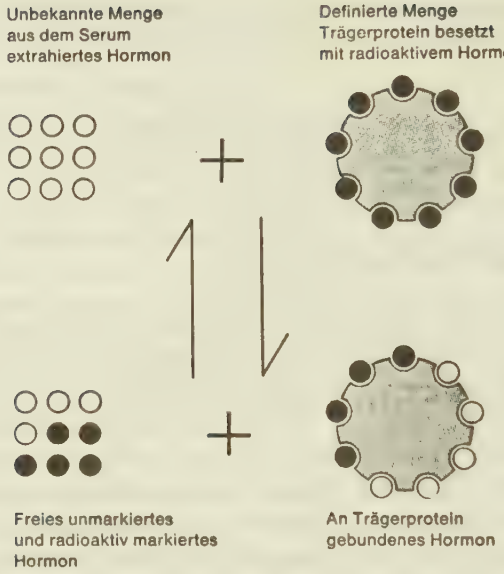

Abb. 1: Prinzip der kompetitiven Eiweißbindungsanalyse (nach 29)

Menge TBG inkubiert. Hierbei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen endogenem und markiertem T_4 an den Bindungsstellen ein. Das nicht proteingebundene T_4 wird durch einen sekundären Akzeptor (z.B. Ionenaustauscher oder Dextrangel) abgetrennt und der freie Anteil durch Messung der Aktivität in einem Zählgerät für Gammastrahlen ermittelt. Die Bestimmung der tatsächlichen Thyroxinkonzentration im Serum erfolgt anhand einer annähernd linearen Standardkurve, die mit Hilfe bekannter T_4-Konzentrationen unter gleichen Bedingungen ermittelt wird.

2.3 Der Enzym-Immuno-Assay (EIA)

ULLMANN u. Mitarbeiter (41, 17) entwickelten die Technik, die im Merckotest®-EMIT®-tfg*) zur Anwendung kommt.

Die Voraussetzung, daß ein Stoff in einem Organismus die Antikörperbildung hervorruft, ist seine Reindarstellung und die immunogene Wirkung. Für einen EIA muß ferner noch die Markierung mit einem Enzym möglich sein. Dies alles ist beim Schilddrüsenhormon Thyroxin gegeben.

Beim genannten Verfahren (Abb. 2) wird zunächst dem Serum NaOH und ein Detergens zugesetzt, um das Thyroxin vom TBG abzutrennen. Dieses freigesetzte, antigen wirkende Thyroxin bringt man mit einer bestimmten Menge eines spezifischen Thyroxin-Antikörpers zusammen. Das gesamte in der Probe enthaltene Thyroxin geht mit diesem T_4-Antikörper eine Bindung ein. Dabei bleiben noch Bindungsstellen an ihm frei. Dem Reaktionsgemisch wird - im Überschuß - enzymmarkiertes Thyroxin zugegeben. Dieses markierte Thyroxin besetzt nun die noch freien Bindungsstellen am spezifischen T_4-Antikörper. Bei diesem Vorgang wird das Markierungsenzym am konjugierten Thyroxin aktiv. Dies liegt an einer Konfigurationsänderung des Enzyms nach der Bindung an den Antikörper (33). Je nach Thyroxingehalt im Serum wird nun mehr oder weniger viel markiertes Thyroxin an den Antikörper gebunden und somit das Enzym entsprechend aktiv. Der Thyroxingehalt der Patientenprobe steht also im umgekehrten Verhältnis zur gemessenen Enzymaktivität.

Bei der folgenden enzymatischen Reaktion wird dem Substrat (Malat) ein Wasserstoffion (H^+) entzogen und das Coenzym NAD in $NADH^+$ übergeführt. Der Anstieg des $NADH^+$ führt zu einer Extinktionsänderung, die photometrisch bei 340 nm gemessen wird. Anhand einer Standardkurve kann so der Thyroxingehalt des Serums bestimmt werden.

---

*) Hersteller: E. Merck, Frankfurter Straße 250, 6100 Darmstadt 1

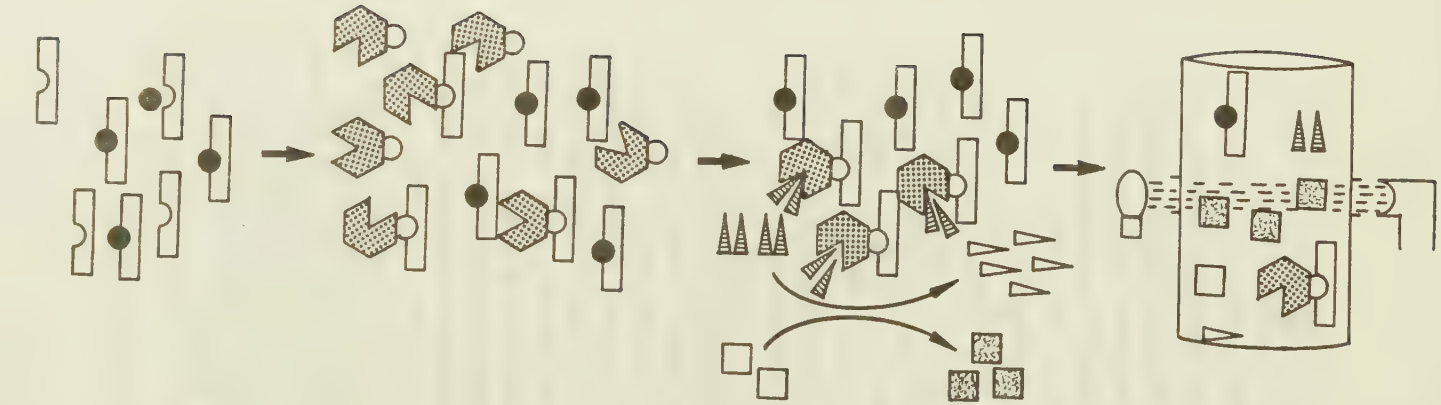

Abb. 2: Prinzip des Enzym-Immuno-Assay (Merckotest®-EMIT®-tfg)

1. Dem Patientenserum wird der spezifische Thyroxin-Antikörper zugesetzt. Das gesamte Serumthyroxin wird an den Antikörper gebunden, jedoch bleiben Bindungsstellen frei.
2. Die noch freien Bindungsstellen des Antikörpers werden durch das im Überschuß zugesetzte enzymmarkierte Thyroxin abgesättigt. Dabei tritt eine Konfigurationsänderung am Markierungsenzym ein.
3. Dieses veränderte Enzym setzt nun das im Überschuß hinzugefügte Substrat um. Damit diese Reaktion ablaufen kann, benötigt das Substrat ein Coenzym.
4. Das umgesetzte Coenzym kann quantitativ im Photometer bestimmt werden.

3. METHODIK DES MERCKOTEST®-EMIT®-TFG

3.1 Reagenzien und Lagerung

Ein Reagenziensatz enthält:

Vorbehandlungsreagenz

Dieses dient zum Lösen des Thyroxins aus seiner Proteinbindung. Das Reagenz besteht aus einer 0,5 N NaOH mit Tensid (Liplex®). Die Gebrauchslösung wird 1 : 4 mit Aqua bidest. verdünnt und ist dann einen Tag haltbar. 20 µl Serum müssen mit 100 µl dieses gebrauchsfertigen Vorbehandlungsreagenz gemischt werden.

Reagenz A

Dieses ist ein lyophilisierter Antikörper gegen Thyroxin mit einem Coenzym-Reagenz, das aus NAD und Gelatine-Stabilisator besteht. Reagenz A kann angesetzt bei einer Temperatur von 2 - 6 °C im Kühlschrank 12 Wochen aufbewahrt werden. Mindestens 30 Minuten vor der Verarbeitung wird das Reagenz mit einem Verdünnungspuffer (1,0 M Glycin Puffer pH 5,0) im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Nach Zusatz des Verdünnungspuffers ist dieses Arbeitsreagenz A allerdings nur noch 30 h bei Zimmertemperatur haltbar. Pro Ansatz werden 50 µl benötigt.

Reagenz B

Dabei handelt es sich um ein enzym-markiertes Thyroxin, ein Thyroxin-Malatdehydrogenase-Konjugat in 40 % Glycerin mit 0,04 M Phosphatpuffer (pH 8,1). Reagenz B ist bei Raumtemperatur 6 Wochen haltbar. Wird es weniger häufig gebraucht, kann es bei Aufbewahrung im Kühlschrank 12 Wochen verwendet werden. Pro Serumprobe werden 25 µl dosiert zugegeben.

ABA-Thyroxin Puffer

Dieser Puffer, der 0,3 M Glycin (0,14 M Apfelsäure) pH 9,5 enthält, wird mit Reagenz B vor Gebrauch im Verhältnis 11 : 1 automatisch gemischt. Er ist bei Raumtemperatur haltbar.

Lyophilisierte Standards ("Kalibratoren")

Die Standards werden mit 1 ml Aqua bidest. angesetzt. Sie enthalten dann die Standard-Konzentrationen 0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0 und 20,0 µg/dl L-Thyroxin. Angesetzt sind sie 12 Wochen bei 2 - 6 °C haltbar.

3.2 Prinzip der automatischen Bestimmung

Der Test wurde mit dem Bichromatic Analyzer ABA 100® *) durchgeführt, dem noch eine Reagenz-Dosiereinheit hinzugefügt ist. Dieses automatische Analysengerät besteht aus der eigentlichen Analyseneinheit und einer Steuer- und Recheneinheit. Die wichtigsten Bestandteile der Analyseneinheit sind das Photometergehäuse, das die optischen Elemente des Photometers enthält, und der Inkubator, der die Temperatur des Reaktionsgemisches auf 37 ± 0,1 °C regelt.

Ein Karussell ist dem Photometergehäuse aufgesetzt und bringt die Einmal-Multiküvette (32 Zellen), in der die Reaktion des Testansatzes stattfindet, in den Strahlengang. Das optische System des Photometers enthält eine Wolfram-Halogenlampe als Lichtquelle, eine rotierende Filterscheibe und eine Photomultiplier-Röhre.

---

*) Hersteller: Abbott Laboratories, South Pasadena, Calif. 91030
Für Deutschland: Abbott GmbH
Diagnostics Division, Ampérestr. 3 - 5
6070 Langen

Die rotierende Filterscheibe filtert abwechselnd Lichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge aus, eine nahe dem Extinktionsmaximum des Chromogens (340 nm/Peak) und eine direkt daneben liegend (380 nm/Side-Band). Hierdurch wird erreicht, daß störende Einflüsse wie Lichtstreuung, Schmutz auf der Küvette und Trübungen des Serums (Hämolyse, Ikterus, Lipide) sich bei beiden Wellenlängen etwa gleichmäßig auswirken. Die Extinktion wird bei diesem bichromatischen System nicht gegen einen Leerwert, sondern als Extinktionsdifferenz aus dem Verhältnis der Lichtintensitäten beider Wellenlängen bestimmt. Diese ist weitgehend unabhängig von einer Änderung der Detektorempfindlichkeit und Lichtintensität.

Neben dem Photometergehäuse befindet sich eine Probe-Reagenz-Dosiereinheit, die automatisch Reagenz B (vgl. 3.1) mit der Pufferlösung ansaugt und gemeinsam in die einzelnen Zellen der Multiküvette einspritzt, während sich das Karussell im Uhrzeigersinn dreht. Von einer zusätzlichen Reagenz-Dosiereinheit wird Reagenz A gleichzeitig - um eine Zelle versetzt - in die Multiküvette eingegeben.

Die Steuer- und Recheneinheit enthält die Bedienungselemente, den Informationsspeicher, den Rechner, die Digitalanzeige und den Drucker. Die T_4-Bestimmung erfolgt als kinetische Messung bei zunehmender Extinktion im Abstand von 5 min. Die erste Messung wird gespeichert, nach der zweiten Messung wird das Verhältnis der Lichtintensitäten in eine digitale Anzeige der Extinktions-Differenz umgesetzt. Diese Differenz ist ein Maß für die Konzentrationsänderung des Chromogens und damit für die Enzymaktivität.

3.3 Testablauf

Zunächst werden die Vorratsbehälter der Analyseneinheit mit den Arbeitsreagenzien beschickt und in die Inkubatorwanne entgastes, destilliertes Wasser eingefüllt.

An einem getrennten Arbeitsplatz wird die Multiküvette unter Verwendung eines Probe-Reagenz-Dosiers*) mit dem Serum-Vorbehandlungsreagenz gefüllt und zwar in folgender Reihenfolge:

Zelle 1	Leerwert
Zellen 2 - 13	Standardseren ("Kalibratoren")
Zellen 14-15	Poolserum
Zellen 16-31	Patienten- bzw. Kontrollseren

Nach mindestens 15 min wird die beschickte Küvette in das 37 °C warme Inkubationsbad des Karussells eingesetzt. In der Zwischenzeit werden auf dem äußeren Kranz des Karussells Plastikhütchen, die den entsprechenden Zellen der Multiküvette zugeordnet sind, mit jeweils 50 µl des enzymkonjugierten Thyroxins (Reagenz B) gefüllt.

Nach 3 min wird das Karussell gestartet. Bei der ersten Umdrehung wird, um eine Zelle versetzt, die Pufferlösung mit dem Reagenz B und Reagenz A (Antikörper) von den zwei Reagenz-Dosiereinheiten gleichzeitig in die Zellen der Multiküvette eingespritzt.

Während der zweiten Karussellumdrehung (Umlaufzeit 5 min) erfolgt die erste Extinktionsmessung (Extinktionsdifferenz ΔE für beide Wellenlängen; vgl. 3.2). Das Karussell bleibt hierzu einige Sekunden in der Position einer Zelle der Multiküvette stehen, und die Recheneinheit speichert das Zwischenergebnis.

---

*) Pipetter Diluter-Modell Syva 1500

Bei der dritten Umdrehung wird die zweite Messung vorgenommen. Gleichzeitig druckt die Steuer- und Recheneinheit die Extinktionsdifferenzen beider Messungen aus. Mit den ausgedruckten Werten wird die Standardkurve auf dem testspezifischen Auswerte-Papier gezeichnet und der T_4-Gehalt der Seren kann auf diesem abgelesen werden.

Für jeden weiteren Durchgang müssen eine neue Multiküvette und die Plastikhütchen erneut mit Seren und Reagenzien gefüllt werden.

3.4 Standardkurve

Um aus den gemessenen Extinktionsdifferenzen die T_4-Konzentrationen der Seren zu erhalten, ist es notwendig, eine Standardkurve zu erstellen. Dazu ist jeder Charge ein nur für sie gültiges testspezifisches Auswerte-Papier beigegeben. Dabei ist auf der Abszisse die T_4-Konzentrationsskala nach empirischen Werten so verzerrt, daß die Standardkurve zur Geraden wird (Abb. 3). Die sechs Standard-Konzentrationen sind besonders hervorgehoben. An der Ordinate sind die Extinktionsdifferenzen ($\triangle E$) aufgetragen. Als Standardkurve wird die Gerade gezogen, die sich den sechs eingetragenen Standardwerten am besten nähert. Die T_4-Konzentration der Seren kann dann über die gemessenen Extinktionsdifferenzen an der Abszisse abgelesen werden.

Nach der Arbeitsanleitung von Merck (21) soll die T_4-Auswertung folgendermaßen erfolgen:

1) Die Bezugsgerade muß für jeden Arbeitstag neu ermittelt werden; sie ist dann für mindestens 8 h verwendbar. Die Stabilität der Bezugsgeraden sollte jedoch für spätere Durchgänge durch Doppelbestimmungen von Kontrollseren überprüft werden.

2) Doppelbestimmungen sollen nicht mehr als 10 Extinktionseinheiten voneinander abweichen.

3) Die Standardpunkte können auch als Einfachbestimmungen ermittelt werden.

4) Ein Standardpunkt darf nicht mehr als 10 Extinktionseinheiten von der Bezugsgeraden entfernt liegen. Ansonsten muß die Bezugsgerade neu ermittelt werden.

5) Die Differenz zwischen dem Kalibrator 0 µg/dl und 2 µg/dl soll 15 - 45 Extinktionseinheiten betragen.

6) Die Differenz zwischen dem Kalibrator 0 µg/dl und 20 µg/dl soll 175 - 275 Extinktionseinheiten betragen.

Anmerkung: Die Forderungen 5 und 6 konnten immer erfüllt werden, da die Differenzbeträge recht groß gewählt sind.

Die aus 28 Testläufen - mit jeweils doppelt bestimmten Standards - gemittelte Standardkurve ist in Abb. 3 wiedergegeben. Dabei sind nur die Standards einer Charge (G01) mit dem dazugehörigen Auswerte-Papier verwendet worden. Diese Charge kann als repräsentativ angesehen werden.

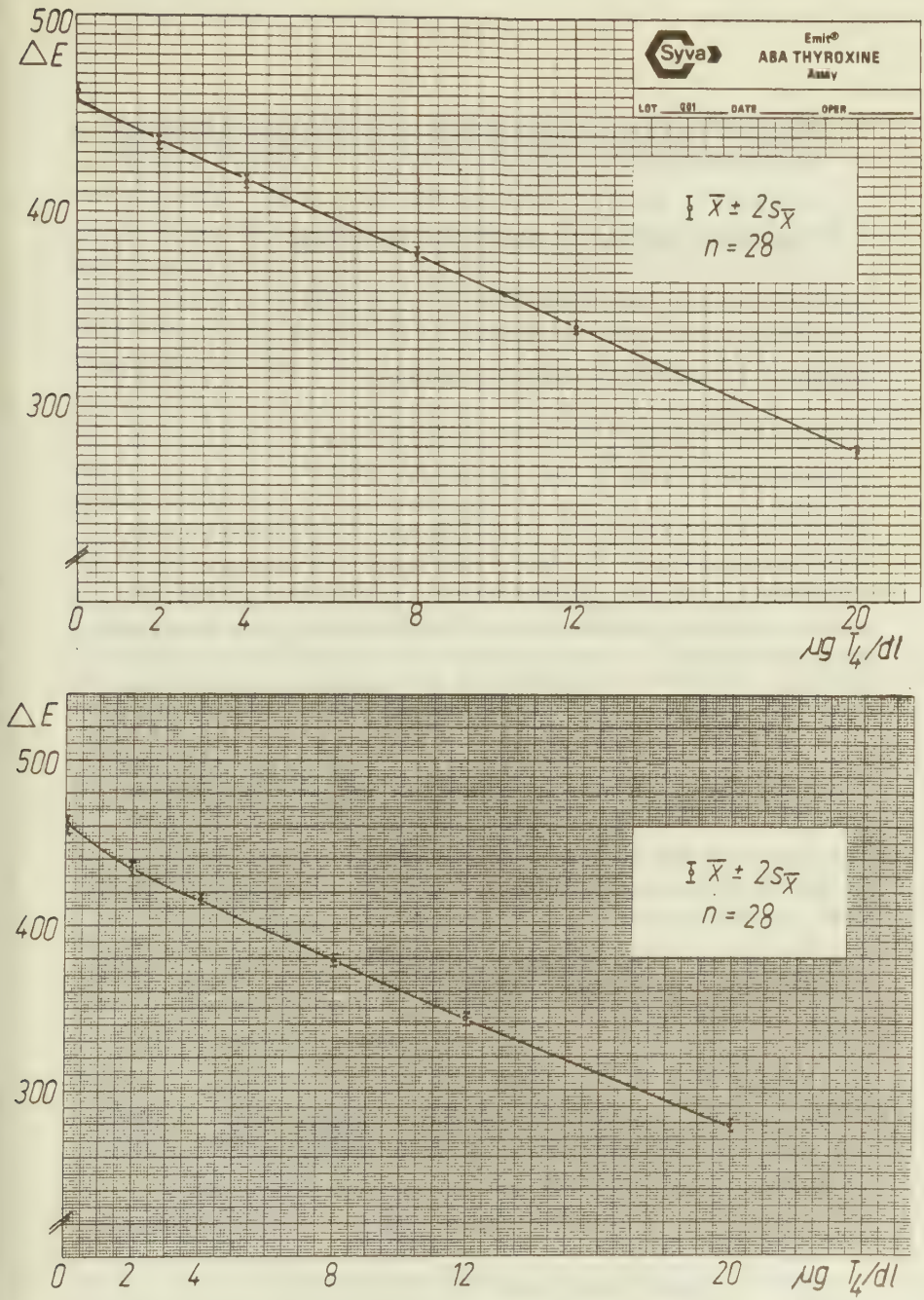

Abb. 3: Gemittelte Standardkurve für eine Charge (G01) beim EIA (oben) unter Verwendung des testspezifischen Auswerte-Papiers (unten) für normales mm-Papier

4. ERGEBNISSE DER METHODISCHEN PRÜFUNG

4.1 Durchführung der Versuche und Statistik

Die Prüfung der EIA-Methode erfolgte simultan mit der routinemäßig durchgeführten CPBA.

Folgende Testbestecke wurden geprüft:

- Tetralut® T_4-Test von Ames (CPBA)*)
- Merckotest®-EMIT®-tfg von Merck (EIA)**)

In unserer Untersuchung, die sich auf Präzision, Richtigkeit, diagnostische Treffsicherheit, Handhabung und Kosten erstreckte, lag der Schwerpunkt beim EIA. Dies bedeutet nicht, daß unterschiedliche Wertmaßstäbe bei den Tests angewendet wurden. Jedoch glaubten wir aufgrund eingehender Erfahrungen (16, 45) den Umfang der Untersuchung mit der CPBA einschränken zu können. So wurden bei der routinemäßig von einer medizinisch-technischen Assistentin durchgeführten CPBA nur Einfachbestimmungen bei den Patientenseren vorgenommen und die Anzahl der Kontrollen reduziert. Aus diesem Grund können keine Aussagen über den Intra-Assay-Variationskoeffizienten für Patientenseren bei der CPBA gemacht werden. Beim EIA wurden von insgesamt 724 Patientenseren rund 200 doppelt bestimmt. Die Messungen des EIA mit dem ABA-100 Analyzer wurden ausschließlich vom Autor durchgeführt.

---

*) Hersteller: Deutsche Miles GmbH, Sparte Ames
Lyoner Str. 6, 6000 Frankfurt/Main

**) Hersteller: E. Merck, Frankfurter Str. 250,
6100 Darmstadt 1

Es war nicht möglich, die Bestimmungen der Patientenseren mit beiden Testarten gleichzeitig vorzunehmen. Daher wurden die Seren am Tag der Blutentnahme mit der CPBA gemessen und sodann tiefgefroren bis zur Bestimmung mit dem EIA aufbewahrt. Die gleichzeitige Messung von Patientenseren ergab mit beiden Methoden statistisch keinen signifikanten Unterschied zum genannten Vorgehen. Man kann somit davon ausgehen, daß das Tiefgefrieren keinen Einfluß auf die Meßergebnisse hat.

Zur Präzisions- und Richtigkeitskontrolle wurden ein Poolserum und drei Kontrollseren mitgeführt. Das Poolserum bestimmten wir bei allen Testläufen doppelt. Es diente auch zur Feststellung, welchen Einfluß die Lagertemperatur auf die Meßergebnisse hat. Vom Poolserum wurden drei Teile gebildet, die im Tiefkühlschrank, im Kühlschrank und bei Zimmertemperatur lagerten.

Die Kontrollseren haben laut Hersteller*) folgenden, mittels "DATA-tope™" T_4-Test festgestellten Gesamtthyroxingehalt:

I	(Low)	= 4,2 µg T_4/dl
II	(Intermediate)	= 9,3 µg T_4/dl
III	(High)	= 16,1 µg T_4/dl

Diese Kontrollseren wurden beim EIA regelmäßig in Doppelbestimmungen gemessen und mindestens einmal am gleichen Tag mit der CPBA bestimmt.

Die Ergebnisse prüften wir nach statistischen Gesichtspunkten. Als Normbereich gilt der 2s-Bereich; er umfaßt etwa 95 % aller Fälle.

Differenzen wurden mit dem t-Test für verbundene und unverbundene Stichproben auf dem 5 % Signifikanzniveau ($P \leq \alpha = 0{,}05$) geprüft.

---

*) Hersteller: Dade Division, American Hospital Supply Corporation, Miami, FL 33 152
Für Deutschland: Merz - Dade GmbH, Lerchenstr. 5, 8000 München 50

4.2 Voruntersuchung zur Präzision und Richtigkeit der Methode beim EIA

4.2.1 Prüfung des Probe-Reagenz-Dosierers

Mit dem Probe-Reagenz-Dosierer "Syva 1500" werden 0,1 ml Arbeitsvorbehandlungsreagenz und 0,02 ml Serum gleichzeitig in die Multiküvette pipettiert und gemischt (vgl. 3.3). Dieser Arbeitsgang ist im Prinzip auch mit einer Kolbenhubpipette durchführbar. Der Probe-Reagenz-Dosierer soll die Arbeitszeit beim Pipettieren verkürzen und den Vorzug der höheren Präzision gegenüber der Kolbenhubpipette haben.

Die Prüfung des Gerätes erfolgte mit J-131, dessen Aktivität im Gamma-Probenwechsler ermittelt wurde. Dabei pipettierten wir Mengen von 0,1 ml und 0,02 ml, mit denen auch bei der Testdurchführung gearbeitet wurde. Simultan mit zwei Eppendorf-Pipetten ergaben sich folgende Variationskoeffizienten für jeweils 10 Pipettierungen:

Gerät	0,1 ml	0,02 ml
Kolbenhubpipette	0,5 %	1,1 %
Probe-Reagenz-Dosierer	0,6 %	1,1 %

Die Präzision beider Pipettierungen ist somit gleich.

Aussagen zur Richtigkeit können nicht gemacht werden. Es ist aber bekannt, daß Pipettierungen mit verschiedenen Eppendorf-Pipetten keine wesentlichen Unterschiede ergeben.

Ferner zeigte sich, daß mit dem Probe-Reagenz-Dosierer etwa 2 % mehr Flüssigkeit gegenüber den Eppendorf-Pipetten pipettiert wurden. Da bei der CPBA die Serummenge (0,1 ml) mit Eppendorf-Pipetten hinzugefügt wird, muß man diesen Umstand bei späteren Vergleichen berücksichtigen.

4.2.2 Differenzen zwischen den Chargen

Beim EIA tragen die Reagenzien und das testspezifische Auswerte-Papier die Nummern der jeweiligen Charge. Es ist nicht möglich, Reagenzien und Auswerte-Papier verschiedener Chargen gemeinsam zu benutzen.

Bei unserer Prüfung erhielten wir insgesamt fünf Lieferungen mit drei unterschiedlichen Chargennummern in der Reihenfolge: G02, G01, G03, G03 und G02.

Es ergab sich, daß die Mittelwerte der Kontrollseren und des Poolserums bei Chargen mit verschiedenen Nummern hochsignifikante Unterschiede zeigten (Tab. 1). Dies dürfte auch für die Patientenseren gelten.

Die folgenden Berechnungen wurden daher zunächst für jede einzelne Charge bzw. Lieferung getrennt durchgeführt. In der letzten Zeile wurden die Ergebnisse aller Chargen zusammengefaßt.

Lieferung/Charge	Poolserum	Kontroll-serum 1	Kontroll-serum 2	Kontroll-serum 3
1 / G02	$8{,}37 \pm 0{,}10$ ($n = 9$)	$4{,}18 \pm 0{,}18$ ($n = 6$)	$9{,}35 \pm 0{,}15$ ($n = 6$)	$17{,}08 \pm 0{,}27$ ($n = 5$)
2 / G01	$7{,}61 \pm 0{,}10$ ($n = 14$)	$3{,}68 \pm 0{,}10$ ($n = 12$)	$8{,}51 \pm 0{,}12$ ($n = 10$)	$16{,}10 \pm 0{,}13$ ($n = 10$)
3 / G03	$7{,}29 \pm 0{,}06$ ($n = 12$)	$3{,}28 \pm 0{,}09$ ($n = 6$)	$8{,}12 \pm 0{,}15$ ($n = 6$)	$15{,}53 \pm 0{,}03$ ($n = 6$)
4 / G03	$7{,}72 \pm 0{,}07$ ($n = 13$)	$3{,}64 \pm 0{,}08$ ($n = 7$)	$8{,}54 \pm 0{,}07$ ($n = 7$)	$16{,}40 \pm 0{,}11$ ($n = 7$)
5 / G02	$8{,}23 \pm 0{,}06$ ($n = 14$)	$4{,}16 \pm 0{,}05$ ($n = 5$)	$8{,}92 \pm 0{,}10$ ($n = 5$)	$16{,}55 \pm 0{,}18$ ($n = 4$)
1-5/ G01-G03	$7{,}82 \pm 0{,}06$ ($n = 62$)	$3{,}74 \pm 0{,}07$ ($n = 36$)	$8{,}66 \pm 0{,}09$ ($n = 34$)	$16{,}27 \pm 0{,}11$ ($n = 32$)

Tab. 1: Mittelwert und mittlerer Fehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) der Doppelbestimmung beim EIA in µg T_4/dl
(n = Zahl der Doppelbestimmungen)

4.2.3 Präzision der Standards

Nach der Testvorschrift kann die Eichkurve durch Einfachbestimmung der 6 Standards erstellt werden. Um diese Angaben in bezug auf eine ausreichende Präzision zu prüfen, führten wir immer Doppelbestimmungen durch. Hierbei wurden zu Beginn jeder Testreihe die 6 verschiedenen Standards mit ansteigendem T_4-Gehalt jeweils zweifach bestimmt.

Insgesamt wurden 306 (51 x 6) Doppelbestimmungen des Standards durchgeführt, von denen 19 eine Extinktionsdifferenz > 10 zeigten (= 6,2 %). Diese Bestimmungen mußten verworfen werden, um die Forderungen für den Test (vgl. 3.4) zu erfüllen. Da bei einem ungültigen Standard die gesamte Standardkurve nicht zu verwerten ist, konnten von den 51 Kurven nur 34 (= 66,7 %) verwendet werden.

4.3 Präzision und Richtigkeit von EIA und CPBA

4.3.1 Intra-Assay-Varianz

Die Intra-Assay-Varianz prüften wir anhand von Doppelbestimmungen der drei Kontrollseren (niedriger, mittlerer und hoher T_4-Gehalt) und eines Poolserums. Beim EIA standen außerdem 181 Patientenseren in Doppelbestimmung zur Verfügung. Die Ergebnisse der Präzisionsprüfung sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengestellt.

In beiden Tests wurden die Doppelbestimmungen jeweils nacheinander durchgeführt. Unter "Ausreißern" werden beim EIA Werte verstanden, die eine Extinktionsdifferenz > 10 zeigen (vgl. 3.4). Um vergleichbare Kriterien bei der CPBA zu erhalten, werden Werte eliminiert, die Differenzen > 0,7 µg T_4/dl zeigen. Bei den Patientenseren sind alle Arten von Schilddrüsenfunktionsstörungen enthalten.

Proben $\bar{x}$ aller Meßergebnisse	mit Ausreißer		ohne Ausreißer*)	
	n	VK (%)	n	VK (%)
Kontrollserum 1 3,1 µg/dl	19	10,1 %	17	7,2 %
Kontrollserum 2 8,6 µg/dl	19	5,0 %	16	2,8 %
Kontrollserum 3 14,8 µg/dl	19	1,7 %	19	1,7 %
Poolserum 7,2 µg/dl	20	1,9 %	20	1,9 %

*) eliminiert wurden Werte mit einer Differenz > 0,7 µg/dl

Tab. 2: Intra-Assay-Variationskoeffizient von Doppelbestimmungen bei der CPBA

Proben $\bar{x}$ aller Meßergebnisse	mit Ausreißer		ohne Ausreißer*)	
	n	VK (%)	n	VK (%)
Kontrollserum 1 3,8 µg/dl	38	7,7 %	38	7,7 %
Kontrollserum 2 8,7 µg/dl	38	5,9 %	34	3,5 %
Kontrollserum 3 16,2 µg/dl	38	5,1 %	32	2,1 %
Poolserum 7,8 µg/dl	64	3,4 %	64	3,4 %
Patientenseren (2s-Bereich 3,8-11,0 µg/dl)	181	3,8 %	171	3,2 %

*) eliminiert wurden Werte mit einer Extinktionsdifferenz > 10

Tab. 3: Intra-Assay-Variationskoeffizient von Doppelbestimmungen beim EIA

Der paarweise Vergleich zwischen der ersten und zweiten Messung der Doppelbestimmung mittels t-Test ergab für den EIA bei Kontrollserum 1 einen signifikanten Unterschied ($P < 0,02$). Die Doppelbestimmungen erfolgten bei den einzelnen Testläufen direkt hintereinander. Im Durchschnitt liegt die erste Bestimmung um 0,15 µg T_4/ dl höher als die zweite. Dieses Ergebnis läßt sich zwanglos durch die Verschleppung des stets dem Kontrollserum 1 vorausgehenden Poolserums erklären, das im T_4-Gehalt etwa doppelt so hoch liegt. Diese Verschleppung dürfte vorwiegend im Probe-Reagenz-Dosierer auftreten, da die Pipettierspitze nicht ausgewechselt, sondern nur abgewischt wird. Sie könnte jedoch auch im Karussell bei Zugabe der Reagenzien erfolgen, wenn die Spritzen der Dosierer in das Reaktionsgemisch eintauchen.

Der dabei auftretende Fehler von etwa 4 % dürfte noch zu tolerieren sein. Er macht sich aber bemerkbar, wenn einem Serum mit hohem T_4-Gehalt eines mit niedrigem folgt.

Die Tatsache, daß die Intra-Assay-Variationskoeffizienten zum Teil über den Variationskoeffizienten des Inter-Assay-Vergleichs liegen (vgl. 4.3.2), kann als Bestätigung einer Verschleppung von Serum aus der Vorprobe gewertet werden.

Bei der CPBA wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messungen der Doppelbestimmungen des Poolserums festgestellt ($P < 0,005$). Der zweite Wert der Doppelbestimmung liegt im Durchschnitt um 1,5 % höher als der erste. Dies könnte auf ein schlechtes Benetzen der Plastikspitzen an der Kolbenhubpipette mit Serum zurückzuführen sein.

4.3.2 Inter-Assay-Varianz

Der Inter-Assay-Variationskoeffizient (nicht immer zutreffend "Varianz von Tag zu Tag" genannt) läßt sich auf verschiedene Weise definieren. Die Ergebnisse unterscheiden sich dabei nicht unerheblich. Jede dieser Möglichkeiten kann begründet werden. Im folgenden sollen daher die einzelnen Arten der Angaben des Inter-Assay-Variationskoeffizienten gegenübergestellt werden:

1) Wegen der Differenzen zwischen den einzelnen Chargen (vgl. 4.2.2) erhält man bei der Mittelung über alle Testläufe eine wesentlich höhere Inter-Assay-Variabilität, als wenn zunächst der VK der einzelnen Charge bestimmt und dann über alle Chargen gemittelt wird. Dies zeigt der Vergleich der Tabellen 4 und 5.

2) Eliminiert man die vorhandenen Ausreißer (vgl. 4.3.1), so wird der VK im allgemeinen kleiner, als wenn sämtliche Testwerte in die Berechnung eingehen.

3) Da der Hersteller auch Einfachbestimmungen zuläßt, wird der VK auch für die jeweils ersten Werte der Doppelbestimmung errechnet. Hierzu müssen sämtliche Meßergebnisse herangezogen werden, da bei Einfachbestimmungen das oben genannte Ausreißerkriterium nicht prüfbar ist.

Proben	EIA			CPBA		
	Mittelwert der Doppelbest. mit Ausreißer	Mittelwert der Doppelbest. ohne Ausreißer	1. Wert der Doppelbest.	Mittelwert der Doppelbest. mit Ausreißer	Mittelwert der Doppelbest. ohne Ausreißer	1. Wert der Doppelbest.
Kontroll-serum 1	10,3 % (n = 38)	10,9 % (n = 36)	10,1 % (n = 38)	13,9 % (n = 19)	10,7 % (n = 17)	17,7 % (n = 19)
Kontroll-serum 2	5,8 % (n = 38)	5,8 % (n = 34)	6,5 % (n = 38)	9,4 % (n = 19)	5,8 % (n = 16)	11,5 % (n = 19)
Kontroll-serum 3	3,5 % (n = 38)	3,7 % (n = 32)	3,9 % (n = 38)	4,4 % (n = 19)	4,4 % (n = 19)	4,2 % (n = 19)
Poolserum	6,1 % (n = 65)	6,1 % (n = 62)	6,3 % (n = 65)	6,5 % (n = 20)	6,5 % (n = 20)	6,6 % (n = 20)

Tab. 4: Inter-Assay-Varianz
Variationskoeffizient (VK%) über alle Werte (ohne Berücksichtigung der Charge)

Proben	EIA			CPBA		
	Mittelwert der Doppelbest. mit Ausreißer	Mittelwert der Doppelbest. ohne Ausreißer	1. Wert der Doppelbest.	Mittelwert der Doppelbest. mit Ausreißer	Mittelwert der Doppelbest. ohne Ausreißer	1. Wert der Doppelbest.
Kontroll-serum 1	6,9 % (n = 38)	7,0 % (n = 36)	7,3 % (n = 38)	12,0 % (n = 19)	10,1 % (n = 17)	15,1 % (n = 19)
Kontroll-serum 2	4,1 % (n = 38)	3,7 % (n = 34)	4,0 % (n = 38)	7,6 % (n = 19)	3,7 % (n = 16)	10,1 % (n = 19)
Kontroll-serum 3	2,2 % (n = 38)	2,0 % (n = 32)	2,8 % (n = 38)	2,7 % (n = 19)	2,7 % (n = 19)	3,0 % (n = 19)
Poolserum	3,7 % (n = 65)	3,6 % (n = 62)	4,5 % (n = 65)	5,9 % (n = 20)	5,9 % (n = 20)	6,3 % (n = 20)

Tab. 5: Inter-Assay-Varianz
Variationskoeffizient (VK%) gemittelt über den Variationskoeffizienten der einzelnen Chargen

4.3.3 Richtigkeit

Die früher erwähnten Kontrollseren (vgl. 4.1) mit niedrigem, mittlerem und hohem T_4-Gehalt dienten zur Prüfung der Richtigkeit. In Abb. 4 sind die 2s-Bereiche der Kontrollseren beider Tests denen für den Referenz-Standard (nach DATA-tope™) gegenübergestellt. Die Mittelwerte sind als gestrichelte Linien eingezeichnet.

In Tab. 6 sind die von uns bestimmten Mittelwerte und mittlere Fehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) der drei Kontrollseren angegeben. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Werte von Dade für den Tetralute® und den DATA-tope™ angefügt. Schon für den Tetralute® ergeben sich zwischen den Angaben von Dade (vgl. 4.1) und den eigenen Bestimmungen signifikante Unterschiede. Teilweise noch stärker unterscheiden sich die Mittelwerte unserer Bestimmungen mit EIA bzw. CPBA. Durch die erheblichen Abweichungen von den angegebenen Sollwerten wird klar, daß man bei keinem Test vom wahren oder richtigen T_4-Gehalt sprechen kann. Die Kontrollseren eignen sich daher nur zur Prüfung der Präzision.

T_4	Testbesteck	Kontroll-serum 1 (µg/dl)	Kontroll-serum 2 (µg/dl)	Kontroll-serum 3 (µg/dl)
Eigene Ergebnisse	EIA (Merckotest®) n = 38	3,8±0,06	8,7±0,08	16,2±0,12
	CPBA (Tetralute®) n = 19	3,1±0,10	8,7±0,19	14,8±0,15
Vergleichswerte von Dade	CPBA (Tetralute®) n = 20	3,6±0,19	8,5±0,27	16,5±0,27
	CPBA (DATA-tope™) n = 60	4,2±0,14	9,3±0,20	16,1±0,22

Tab. 6: Mittelwerte und mittlere Fehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) der Kontrollseren

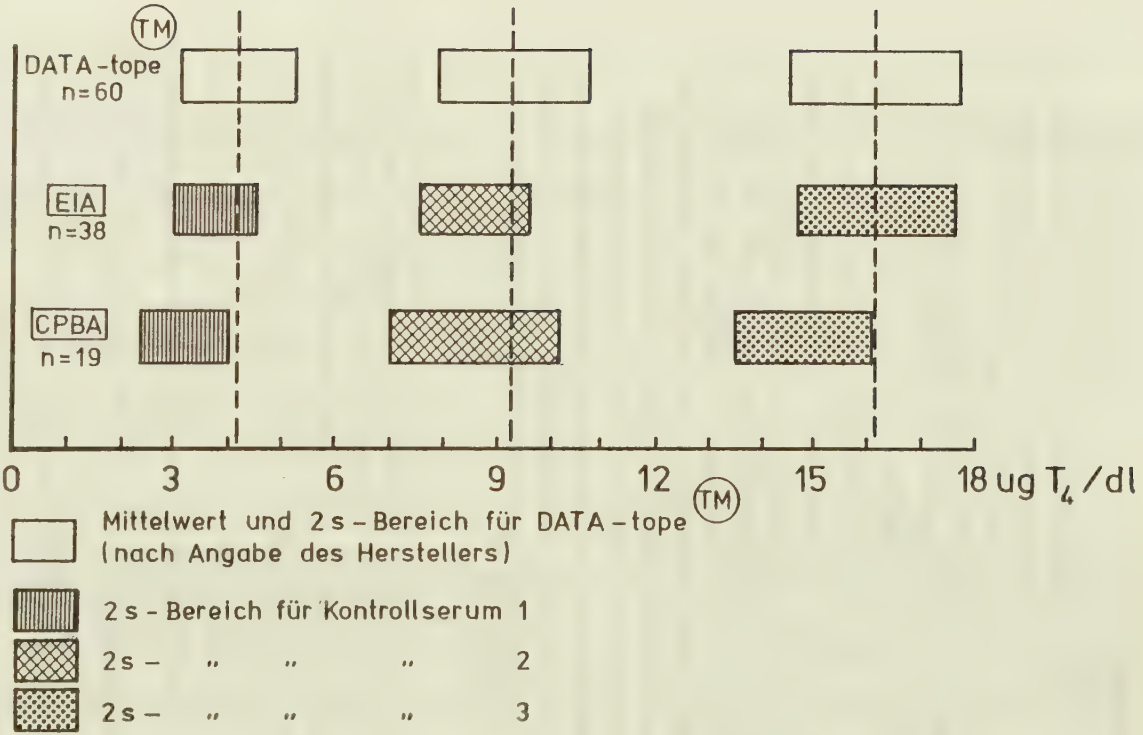

Abb. 4: 2s-Bereiche der 3 Kontrollseren

4.4 Einfluß der Lagertemperatur

Das Poolserum wurde dreigeteilt verschlossen aufbewahrt (vgl. 4.1). Der erste Teil lagerte bei -21 °C tiefgefroren, der zweite bei +4 °C im Kühlschrank und der dritte bei +21 °C im Raum.

Über einen Zeitraum von 36 Tagen wurde der T_4-Gehalt für beide Tests beobachtet. Am Beginn des Versuchs wurden die Tests in kürzeren Zeitabständen, später in längeren durchgeführt. Abb. 5 zeigt den an Doppelbestimmungen gemittelten Verlauf der T_4-Messung.

Während des gesamten Beobachtungszeitraums zeigte sich bei beiden Methoden kein Trend. Beim EIA wurden keine größeren Schwankungen beobachtet. Dagegen zeigte die CPBA bei Raumtemperatur erhebliche Schwankungen, vor allem nach mehr als 3 Wochen.

Tab. 7 gibt Aufschluß über Mittelwerte und Variationskoeffizienten der T_4-Bestimmung bei den verschiedenen Lagertemperaturen.

Lagertemperatur	EIA		CPBA	
	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (µg/dl)	VK%	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (µg/dl)	VK%
-21 °C	8,10 ± 0,20	7,2 %	7,63 ± 0,17	6,6 %
+ 4 °C	8,08 ± 0,24	8,7 %	7,70 ± 0,10	3,7 %
+21 °C	8,87 + 0,10	3,4 %	9,50 + 0,61	19,3 %

Tab. 7: Mittelwert, mittlerer Fehler und Inter-Assay-Variationskoeffizient der T_4-Bestimmung des Poolserums bei verschiedener Lagertemperatur (n = 9)

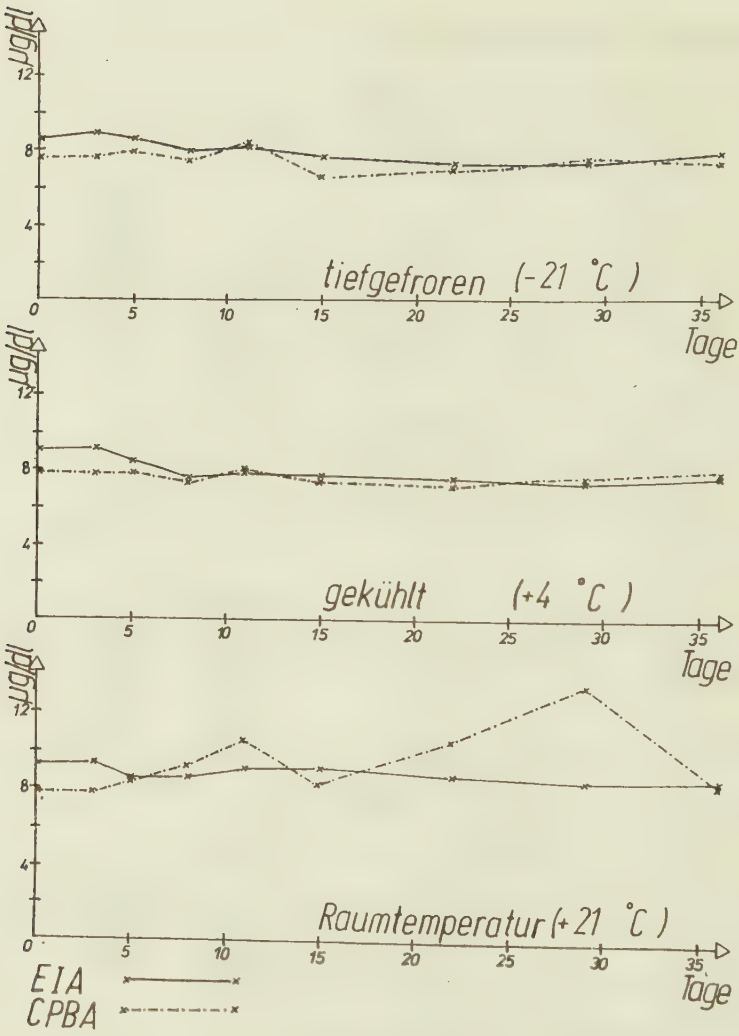

Abb. 5: Gemessene T_4-Konzentration in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur der Lagerung (Mittelwerte von Doppelbestimmungen)

Eine Analyse des Serums ergab einen Anstieg unveresterter Fettsäuren, der für das genannte Phänomen verantwortlich sein dürfte (31, 32). So fanden sich nach 36 Tagen beim tiefgefrorenen Serum 0,2 mmol/l, beim gekühlten 0,4 mmol/l und bei im Raum aufbewahrten 1,9 mmol/l unveresterte Fettsäuren.

Der Versuch zeigt deutlich eine relative Robustheit des EIA bei längerer Lagerung.

4.5 Testdauer, Handhabung und Kosten

Von den bisher bei uns geprüften T_4-Bestimmungsmethoden mittels CPBA und RIA bevorzugen wir den Tetralute®-Test wegen seiner einfachen Handhabung und der kurzen Testdauer (45, 35).

Die gesamte Testdauer ist beim Tetralute®-Test und Merckotest®-EMIT®-tfg für die ersten 30 Einfachbestimmungen (incl. der Standards) vergleichbar; sie beträgt etwa 90 min.

Bei größeren Serien ist der EIA der CPBA jedoch überlegen, da für jeweils weitere 30 Bestimmungen nur noch zusätzlich 20 min benötigt werden. Dagegen ergibt sich beim Tetralute®-Test keine wesentliche Arbeitszeitverkürzung.

Pro Einzelbestimmung wird für den EIA eine deutlich geringere Serummenge benötigt, nämlich 20 µl, gegenüber 100 µl bei der CPBA.

Beide Methoden arbeiten mit Standards, die zu jeder Charge neu angesetzt werden. Dabei kommt die CPBA mit 4 Standardpunkten aus, während der EIA 6 benötigt. Dazu ist zu bemerken, daß bei der CPBA für jeden Testlauf (insgesamt 28 Proben) eine Standardkurve erstellt werden muß. Beim EIA wird dagegen für eine Testserie, die aus mehreren aufeinander folgenden Testläufen (jeweils 30 Proben) bestehen kann, nur eine Standardkurve gefordert.

Beide Tests entsprechen sich im Laborbedarf. Für die CPBA müssen die gesetzlichen Strahlenschutzbestimmungen beachtet werden, die seit Inkrafttreten der Strahlenschutzverordnung vom 13. Okt. 1976 (StrlSchV) erheblich verschärft wurden.

Die Sachkosten der Tests betragen:

	Tetralute®	Merckotest®-EMIT®-tfg
Preis pro Charge	155,-- DM	1510,-- DM
(Ansätze pro Charge)	(28)	(500)*)
Preis pro Probe	5,54 DM	3,02 DM
Preis pro Patienten-Einzelbestimmung	7,05 DM	4,12 DM

In der Kalkulation für die Patienten-Einzelbestimmung sind Kontrollseren in Doppelbestimmung und 4 (CPBA) bzw. 6 (EIA) Standards in Einzelbestimmung enthalten.

Die Anschaffungskosten für die Geräte sind nur bedingt vergleichbar. Der Preis von rund 67 000.- DM für den ABA 100 Analysator mit Zusatzgeräten übersteigt die Ausgaben für das beim CPBA notwendige Gammazählgerät. Falls Einrichtungen für den Strahlenschutz nicht bereits vorhanden sind, entstehen für radioaktive In-vitro-Tests zusätzliche Kosten.

---

*) Die Firma Merck geht bei ihrer Kalkulation von der Möglichkeit aus, bis zu 600 Ansätze pro Charge durchzuführen. Bei unserer Testdurchführung gelang es uns aber nicht, mehr als 450 Testansätze aus einer Charge zu gewinnen. Dies steht mit der Anzahl der täglich durchgeführten Bestimmungen im Zusammenhang, denn bei Beschickung der Geräte mit den Reagenzien ergibt sich immer ein Verlust in den Dosier- und Schlauchsystemen.

Wir führten 60 bis 120 Ansätze pro Tag durch. Es ist nur möglich auf 600 Ansätze pro Charge zu kommen, wenn wesentlich mehr Bestimmungen pro Tag durchgeführt werden.

5. ERGEBNISSE DER KLINISCHEN PRÜFUNG

5.1 Untersuchungsgut

Die Seren zur Prüfung der Tests stammen von Patienten der Abteilung für Nuklearmedizin der Universität Würzburg. Die Untersuchungen fanden im Zeitraum von Januar 1978 bis April 1978 statt.

Die klinische Diagnostik wurde anhand eines anamnestischen und klinischen Fragebogens durchgeführt (5, 6). Die Anamnese erfaßte insbesondere Medikamente, die den Schilddrüsenhormonhaushalt beeinflussen können. Bei allen Patienten wurden neben der Gesamtthyroxinbestimmung im Serum (T_4) zusätzliche nuklearmedizinische In-vitro-Untersuchungen (T_3U, RIA-T_3, TSH) durchgeführt. Bis auf wenige Ausnahmen wurde auch ein Schilddrüsenszintigramm mit ^{99m}Tc-Pertechnetat veranlaßt (3, 4).

Insgesamt wurden 724 Patientenseren untersucht, wovon 596 sich eindeutig (u.a. auch nach dem klinischen Verlauf) in folgende Funktionsgruppen gliedern lassen (Tab. 8):

175 Patienten mit Euthyreose (43 Männer und 132 Frauen)
90 Patienten mit Hyperthyreose (davon vier T_3-Hyperthyreosen)
60 Patienten mit Hypothyreose
14 euthyreote Patientinnen unter Einnahme oraler Kontrazeptiva
14 euthyreote Patientinnen bei Gravidität
94 euthyreote Patienten nach Strumaresektion
22 Patienten mit einem autonomen Adenom der Schilddrüse

Die Testergebnisse von 127 weiteren Patienten wurden für die vorliegende Untersuchung nicht herangezogen, da extrathyreoidale Erkrankungen bzw. Schilddrüsen-Neoplasmen vorlagen oder eine schilddrüsenspezifische Therapie durchgeführt worden war.

Eine Auftrennung in Frauen und Männer unterblieb, da in keiner Gruppe ein Geschlechtsunterschied statistisch zu sichern war.

Bei der Analyse der Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß der überwiegende Teil der Patienten aus einem typischen Strumaendemiegebiet stammt; hier liegen die T_4-Werte im Mittel niedriger als in Nichtendemiegebieten.

5.2 Vergleich der Mittelwerte

Die arithmetischen Mittelwerte sowie die Mediane und Variationskoeffizienten der einzelnen Patientengruppen sind in Tab. 8 zusammengestellt. Auch hier zeigt sich, wie bereits bei der Qualitätsprüfung (vgl. 4.3.3), daß der EIA allgemein höhere Testwerte liefert als die CPBA. Die Unterschiede der arithmetischen Mittelwerte sind hochsignifikant.

5.3 Diagnostische Treffsicherheit

In den Abb. 6 und 7 wird die diagnostische Trennschärfe vom Tetralute®-Test und Merckotest®-EMIT®-tfg verglichen. Die 2s-Normbereiche, die etwa 95 % der Patienten erfassen, sind besonders hervorgehoben. Für beide Testarten sind die 2s-Bereiche euthyreoter Patienten enger als die vom Hersteller angegebenen Normbereiche (Tab. 9).

Bei beiden Tests ist die Trennschärfe vergleichbar gut. In der Gruppe der Hyperthyreosen sind die vier niedrigsten falsch negativen Werte T_3-Hyperthyreosen. Bei den Hypothyreosen liegt die T_4-Konzentration bei der CPBA häufig unter der Nachweisgrenze, während dies beim EIA selten der Fall ist. Patientinnen unter Einnahme von

Befund	n	EIA $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (µg/dl)	EIA $\tilde{x}$ (µg/dl)	EIA VK%	CPBA $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (µg/dl)	CPBA $\tilde{x}$ (µg/dl)	CPBA VK%
Euthyreose	175	7,42 ± 0,14	7,5	24,3	6,31 ± 0,16	6,1	32,1
Hyperthyreose	90	-	16,6	-	-	14,9	-
Hypothyreose	60	-	1,5	-	-	1,0	-
Ovulationshemmer-Anwendung	14	9,32 ± 0,59	9,5	23,8	7,97 ± 0,68	8,3	31,8
Gravidität	14	16,05 ± 1,69	18,8	39,4	14,67 ± 1,50	10,4	38,4
Strumaresektion	94	6,67 ± 0,17	6,3	25,2	5,39 ± 0,17	5,0	30,7
Autonomes Adenom	22	9,70 ± 0,64	9,0	30,8	8,66 ± 0,69	7,3	37,6
Hyperthyreose unter Therapie	8	8,35 ± 2,28	5,4	77,3	7,44 ± 2,75	4,6	104,7
Hypothyreose unter Therapie	17	11,70 ± 0,67	12,3	23,7	10,48 ± 0,76	10,4	30,0
Strumaresektion und Hypothyreose	28	3,82 ± 0,25	4,0	34,7	2,42 ± 0,17	2,6	37,9
Strumaresektion und Ovulationshemmer	9	9,28 ± 0,37	9,2	11,8	7,36 ± 0,51	6,7	21,0
Strumaresektion unter Therapie	3	11,57 ± 0,54	11,2	8,0	11,00 ± 0,38	11,3	6,0
Exophthalmus	4	9,38 ± 1,46	8,2	31,1	9,75 ± 1,16	9,2	23,8
Neoplasma unter Therapie	52	13,94 ± 0,51	14,0	26,4	12,53 ± 0,42	13,1	24,0
Neoplasma unter Ther. u. Ovulationshemmer	6	17,48 ± 1,47	16,7	20,6	15,17 ± 1,35	14,8	21,7

Tab. 8: Mittelwert mit mittlerem Fehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), Median ($\tilde{x}$) und Variationskoeffizient (VK) für alle untersuchten Patientengruppen

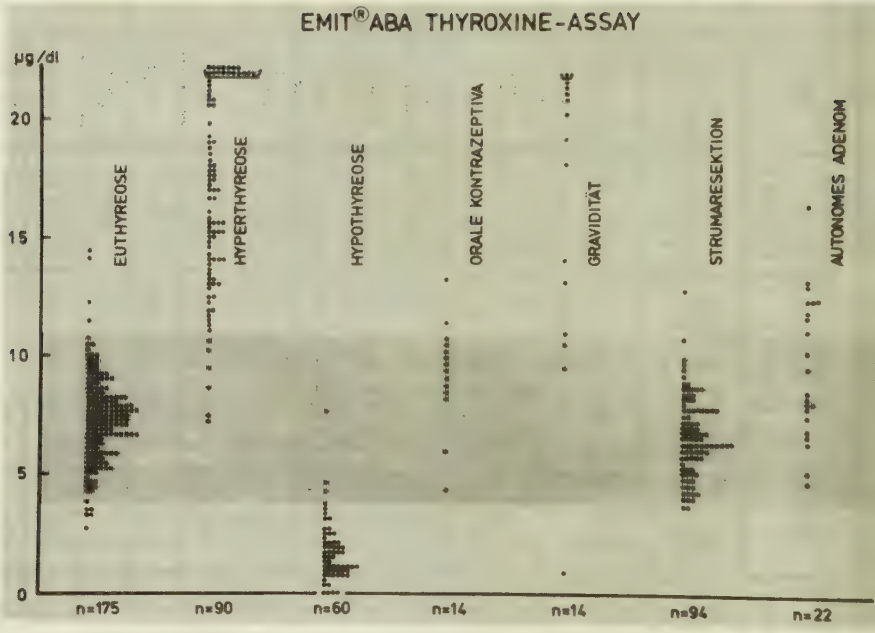

Abb. 6: Verteilung der Testwerte für den EIA "Merckotest®-EMIT®-tfg" (Normalbereich schraffiert)

Testbesteck	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (µg/dl)	$\tilde{x}$ (µg/dl)	2s-Bereich (µg/dl)	vom Hersteller angegebener Normbereich (µg/dl)
EIA Merckotest®-EMIT®-tfg	7,42 + 0,14	7,5	3,8 - 11,1	4,5 - 12,0
CPBA Tetralute®	6,31 + 0,16	6,1	2,3 - 10,4	4,7 - 10,7

Tab. 9: Mittelwert mit mittlerem Fehler ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), Median ($\tilde{x}$) und 2s-Bereich für die Gruppe der euthyreoten Patienten (n = 175)

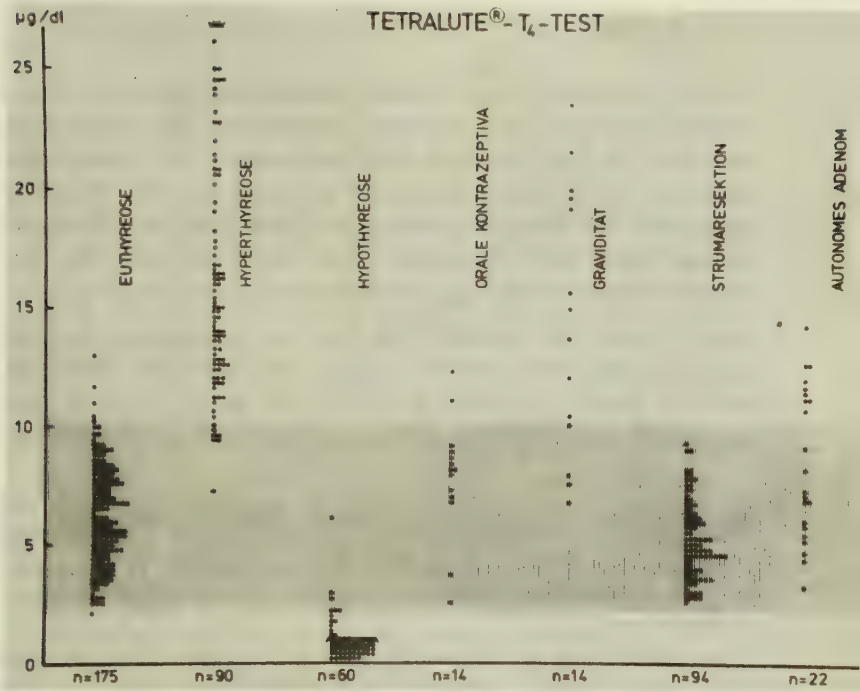

Abb. 7: Verteilung der Testwerte für die CPBA "Tetralute®" (Normalbereich schraffiert)

Östrogenen und in der Schwangerschaft zeigen eine signifikante Erhöhung der Mittelwerte gegenüber den euthyreoten Patienten. Dies liegt an der Vermehrung der Trägerproteine, die zu einem Anstieg des Thyroxingehaltes im Serum führt. Die Testwerte der Strumektomierten mit euthyreoter Stoffwechsellage liegen bis auf eine Ausnahme alle im 2s-Bereich.

5.4 Korrelation

In der folgenden Untersuchung wurden die beiden Tests nach der Methode der linearen Regression und Korrelation geprüft. In Tab. 10 sind die Gleichungen der Regressionsgeraden, die Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzgrade für den euthyreoten und den gesamten Bereich zusammengestellt. Es ergibt sich besonders über den gesamten Bereich eine enge Korrelation beider Tests.

Abb. 8 zeigt die Korrelation für die euthyreote, hyperthyreote und hypothyreote Gruppe innerhalb der Meßbereiche der Tests. Der Raum zwischen den gestrichelten Linien gibt den 2s-Bereich des jeweiligen Tests wieder.

Patientengruppe	Regressionsgerade	Korrelationskoeffizient	Signifikanzgrad
euthyreoter Bereich n = 175	y = -0,43 + 0,91x	r = 0,81	P < 0,001
gesamter Bereich n = 535	y = -0,63 + 0,94x	r = 0,95	P < 0,001

Tab. 10: Korrelation von Tetralute® und Merckotest®-EMIT®-tfg

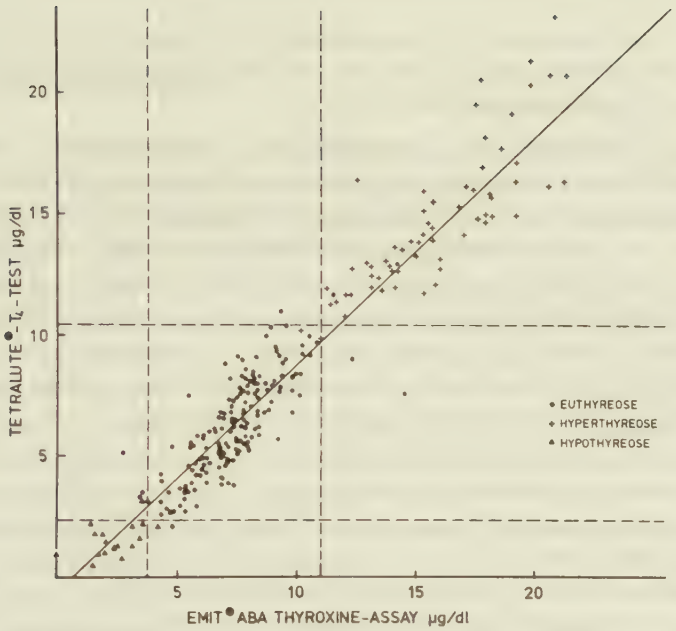

Abb. 8: Korrelation von EIA "Merckotest®-EMIT®-tfg" und CPBA "Tetralute®"

5.5 Bestimmung bei hohem und niedrigem T_4-Gehalt

Bei sehr niedrigen T_4-Konzentrationen treten bei der Bestimmung Schwierigkeiten auf. Hierzu wird beim Tetralute®-Test folgendermaßen verfahren:

Liegen die Werte unter 3,0 µg T_4/dl, ist der Test mit der vierfachen Serummenge zu wiederholen. Das Resultat ist dann durch vier zu teilen. Bei Werten über 16 µg T_4/dl wird bei der Wiederholung die halbe Serummenge verwendet und das Resultat mit zwei multipliziert. Dabei ist jedoch eine Beeinflussung der Ergebnisse infolge des geänderten Serumvolumens nicht auszuschließen. Im Bereich von 3 - 16 µg T_4/dl ist die Standardkurve annähernd linear; eine Extrapolation darüber hinaus ist nicht sinnvoll.

Beim Merckotest®-EMIT®-tfg werden vom Hersteller keine Erläuterungen zu Meßwerten gegeben, die über den Bereich der Standardkurve hinausgehen. Diese umfaßt allerdings den großen Bereich von 0 - 20 µg T_4/dl. Bei Meßwerten, die darüber lagen, verdünnten wir das Serum mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 1. Das Ergebnis multiplizierten wir mit zwei, um den wahren T_4-Gehalt zu erhalten. Es zeigte sich jedoch, daß es bei Doppelbestimmungen zu erheblichen Schwankungen kam, was in den geringen, und damit schlecht manipulierbaren Serummengen begründet sein dürfte. Eine genaue Bestimmung ist also beim EIA nur bis 20 µg T_4/dl möglich.

6. DISKUSSION

6.1 Methodik der Tests

Bei den in dieser Arbeit untersuchten T_4-Tests stehen sich ein Vertreter der kompetitiven Eiweißbindungsanalyse (CPBA), der Tetralute®-Test und ein homogener Enzym-Immuno-Assay (EIA), der Merckotest®-EMIT®-tfg, gegenüber.

Beide Tests messen das Gesamtthyroxin im Serum, allerdings arbeiten sie nach unterschiedlichen Methoden: Das EIA-Prinzip beruht auf einem immunologischen Verfahren, zu dem Thyroxin-Antikörper notwendig sind und für das der Serumthyroxingehalt quantitativ mit einem Photometer bestimmt wird. Dagegen wird bei der CPBA das Thyroxin an ein Protein (Referenz-TBG) gebunden; der quantitative Nachweis erfolgt mit einem Meßgerät für Gammastrahlen. Beide Methoden benötigen ein markiertes Thyroxin, das bei der CPBA mit dem Radioisotop J-125 markiert ist, während beim homogenen EIA hierzu das Enzym Malatdehydrogenase verwendet wird.

Als Markierungsnuklid hat sich bei der CPBA J-125 durchgesetzt (28). Dagegen beschreibt WISDOM (47) die Möglichkeit, beim EIA mit verschiedenen Enzymen zu arbeiten und so unterschiedliche Stoffe in einem Ansatz gleichzeitig zu analysieren. Für die Wahl des geeigneten Enzyms werden von EGGSTEIN et al. (10) folgende Kriterien genannt: Das Enzym muß in hoher Reinheit, stabil und möglichst billig sein. Es muß eine hohe Spezifität und Aktivität im Assay entwickeln können und darf im biologischen Material nicht beeinträchtigt werden. ROWLY et al. (33) erforschten mehr die Bindung und Aktivität von Enzymen im Zusammenhang mit dem Morphinnachweis. SCHARPÉ et al. (38) geben in einer Übersichtsarbeit die für verschiedene EIA's verwendbaren Enzyme, Coenzyme und ihre Gewinnung an.

Vergleicht man die Analysenschritte, so entfällt beim homogenen EIA gegenüber der CPBA die Trennung von gebundenem und ungebundenem Thyroxin nach der Reaktion. Hier wird die im Vergleich zum RIA als unkompliziert bezeichnete Analysenmethode der CPBA (16, 45) noch von dem EIA übertroffen.

Dies ist allerdings nicht bei allen enzymimmunologischen Methoden der Fall. Die von ENGVALL et al. (11), AVRAMEAS et al. (2), van WEEMAN et al. (46) und MIEDEMA et al. (22) angewandte heterogene ELISA-Technik trennt noch das freie vom gebundenen Antigen. Diese Technik kann in vier Testprinzipien unterteilt werden (39, 47):

1) Der kompetitive EIA, vergleichbar mit dem klassischen RIA (48).

2) Der immunoenzymometrische Assay, vergleichbar mit dem immunoradiometrischen Assay (23).

3) Der Sandwich-Antigen-Assay, dessen Antikörper an einer Festphase haftet, wobei das daran gebundene Antigen mit einem enzymmarkierten zweiten Antikörper nachgewiesen wird. Mit dieser Methode wurden schon T_4- und T_3-Bestimmungen durchgeführt (18).

4) Der Sandwich-Antikörper-Assay, dessen Antigen an einer Festphase haftet, wobei der daran gebundene Antikörper durch einen enzymmarkierten zweiten Antikörper nachgewiesen wird.

Mit den Methoden 1 - 3 lassen sich nur Antigene, mit der Methode 4 nur Antikörper nachweisen.

Erst bei dem 1972 von RUBENSTEIN et al. (34) eingeführten homogenen EIA, der EMIT®-Technik, die auch im Merckotest®-EMIT®-tfg angewendet wird, entfällt der Trennungsschritt. Von VOGT et al. (43, 44) wurden diesem homogenen EIA wegen seiner einfachen Handhabung und Automatisierbarkeit der Vorzug vor anderen Analysenverfahren gegeben.

Nach LEUTE et al. (20) funktioniert diese Methode nur, wenn das Haptenmolekül klein ist, so daß ein enger räumlicher Kontakt zwischen Antikörper und Markerenzym entstehen kann. Bei zu großen Molekülen kann das katalytische Zentrum des Markerenzyms nicht mehr vom Antikörper beeinflußt werden. Dieser homogene EIA eignet sich daher zum Nachweis folgender Stoffgruppen: Kardioaktive Verbindungen, Drogen, Antibiotika, Antidepressiva, Antikonvulsiva, Antiasthmatika, Zytostatika und Hormone.

Die unterschiedlichen Techniken des EIA werden in Übersichtsarbeiten von SCHARPÉ et al. (38), WISDOM (47), EGGSTEIN et al. (10), HAECKEL et al. (15) und VOGT et al. (43) näher erläutert.

6.2 Lagerfähigkeit

Nach Angaben des Herstellers sind beim EIA die angesetzten Reagenzien mindestens 6 Wochen und höchstens 12 Wochen haltbar, je nachdem, ob die Lagerung bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank erfolgt. Bei der CPBA sind die einmal angesetzten Reagenzien höchstens 1 Woche haltbar.

Allgemein ist die Haltbarkeit eines EIA größer als die einer CPBA. Dies liegt daran, daß die Aktivität des J-125 mit einer Halbwertzeit von 60 Tagen abnimmt. VOGT et al. (43) beschreiben eine Haltbarkeit der markierten Reagenzien für den EIA von über 6 Monaten, in vielen Fällen länger als ein Jahr.

Der Einfluß von Temperatur und Zeit der Lagerung bei einem gelagerten Serum ist in Kapitel 4.4 dargelegt. Hier erweist sich der EIA als sehr stabil bei einem über 5 Wochen bei Raumtemperatur gelagerten Serum. Dagegen zeigt die CPBA erhebliche Schwankungen; der Mittelwert steigt während der Lagerung an. Dies liegt wahrscheinlich am Anstieg unveresterter Fettsäuren. ROOTWELT (31, 32) untersuchte den Ein-

fluß von Fettsäuren auf die T_4-Konzentration bei der CPBA. Danach korreliert der T_4-Anstieg mit der Konzentrationszunahme an unveresterten Fettsäuren. Er nimmt an, daß die unveresterten Fettsäuren kompetitiv T_4 von den T_4-bindenden Serumproteinen verdrängen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Der EIA ist relativ unempfindlich bei falsch oder zu lange gelagertem Serum; die Meßgenauigkeit bleibt über längere Zeit erhalten.

6.3 Störfaktoren

Die Ergebnisse von T_4-Tests werden durch Vermehrung der thyroxinbindenden Proteine (TBG), wie sie besonders in der Schwangerschaft und unter Östrogenvorbehandlung stattfindet, beeinflußt (29). Hier zeigen beide Tests signifikant erhöhte Werte. Ein unterschiedliches Verhalten zwischen CPBA und EIA ist nicht festzustellen.

Die Messungen beim EIA "Merckotest®-EMIT®-tfg" wurden mit dem Bichromatic Analyzer ABA 100 vorgenommen. Der Test kann auch mit einem einfachen Photometer durchgeführt werden. Allerdings soll der Vorteil des automatischen Analysengerätes nicht nur in der Zeitersparnis, sondern auch in der höheren Genauigkeit liegen. Da die Extinktionsmessung nicht gegen einen Leerwert vorgenommen, sondern als Verhältnis der Lichtintensitäten von zwei Wellenlängen bestimmt wird, vermindern sich störende Einflüsse (vgl. 3.2).

Wir konnten in unserer Untersuchung keine Unterschiede bei getrübten Seren (durch Hämolyse, Lipämie oder Bilirubin) zwischen EIA und CPBA feststellen. Allerdings weisen andere Autoren, die mit dem gleichen Analysengerät gearbeitet haben, auf Beeinflussung des EIA durch diese Störfaktoren hin. FINLEY (12) macht folgende Angaben:

Bis	4	g/l	Lipämie (Triglyceride)	keine	Beeinflussung
"	180	mg/l	Bilirubin	"	"
bei	200	mg/l	" "	5 %	Konzentrationsminderung
"	11	g/l	Hämoglobin	60 %	" "
"	5,5	g/l	" "	38 %	" "
"	2,75	g/l	" "	28 %	" "
"	2	g/l	" "	10 %	" "
"	1,6	g/l	" "	keine Beeinflussung	

Die Kreuzreaktion mit Trijodthyronin beträgt 1 %, mit D-Thyroxin 100 %.

VOGT (44) schreibt dazu (sinngemäß): Bei lipämischen Seren ergibt sich eine zufriedenstellende Wiederfindung von T_4, außer bei Triglyceridwerten von 2960 mg/dl nach Ultrazentrifugation. Bilirubinkonzentrationen von 4 mg/dl ergeben keine größeren Schwankungen, und auch Hämoglobinkonzentrationen von 150 mg/dl beeinflussen die Meßwerte nicht.

Der gleiche Autor macht beim EIA auf ein Phänomen aufmerksam, daß sich allerdings bei der bichromatischen Analyse nicht auswirken kann. So soll eine geringe Enzymaktivität auch bei dem inaktiven enzymmarkierten Antigen, das noch nicht am Antikörper gebunden ist, vorhanden sein.

6.4 Automatisierung des EIA

Ein Vorzug des EIA gegenüber der CPBA und dem RIA ist die Anwendbarkeit in einfach ausgestatteten Labors, die keiner Strahlenschutzeinrichtung bedürfen. So genügt zur enzymatischen T_4-Bestimmung ein einfaches Digitalphotometer.

Allerdings läßt sich bei Verwendung eines automatischen Analysengerätes die Präzision erhöhen und die Arbeitszeit erheblich verkürzen. Einige Arbeitsgruppen haben mit den Geräten ABA 100 (12, 44), Kem-O-Mat (Coulter, England) (30) und LKB (Bromma, Schweden) (13) in der enzymatischen T_4-

Bestimmung Erfahrungen gesammelt. In einem Vergleich von automatischer und manueller Bestimmung zeigte sich mit dem automatischen Photometer eine höhere Genauigkeit in der T_4-Wiederfindung (42).

Den automatischen Analysengeräten kann auch ein programmierbarer Rechner mit Plotter angeschlossen werden. Damit wäre das Problem der Datenauswertung zu lösen, das von uns graphisch mittels des testspezifischen Auswerte-Papiers (vgl. 3.4) vorgenommen wurde. Als mathematisches Verfahren bei der EMIT®-Technik empfiehlt SANDEL (37) die gewichtete Logit-log-Regression, die mit der guten Linearisierbarkeit der Standardkurve begründet wird.

Wir selbst berechneten für einen Testlauf mit 15 Doppelbestimmungen mittels splinefunction bei sechs Standardkonzentrationen die T_4-Konzentrationen von Patientenseren. Beim Vergleich mit den graphisch ermittelten Werten ergaben sich keine höheren Konzentrationsunterschiede als 0,1 µg T_4/dl. Dies läßt die graphische Methode als ausreichend genau erscheinen.

6.5 Zuverlässigkeit der Standardkurve

Über die gesamte Untersuchungsdauer erstellten wir für den EIA 51 Standardkurven mit je 6 Standards, jedoch konnten unter Beachtung der Testanleitung 17 Standardkurven nicht verwertet werden (vgl. 3.4 und 4.2.3), weil meist ein Standard von sechs in der Doppelbestimmung eine zu große Abweichung zeigte. Aufgrund dieser Unsicherheit empfehlen wir immer Doppelbestimmungen der Standards durchzuführen, obwohl die Testanleitung auch Einfachbestimmungen zuläßt. Die Patientenbestimmungen selbst können als Einfachbestimmungen ausgeführt werden, da der Intra-Assay-Variationskoeffizient etwa 3,5 % beträgt (vgl. Tab. 3).

Laut Testvorschrift ist die Standardkurve an einem Arbeitstag für mindestens 8 Stunden verwendbar. Darüber hinaus sind wir der Meinung, daß in jedem Fall eine neue Standardkurve erstellt werden muß, wenn verbrauchte Arbeitsreagenzien frisch angesetzt werden. Unterschiede in den Mischungsverhältnissen könnten hier erhebliche Fehler verursachen.

6.6 Präzision und Korrelation von EIA und CPBA

Beim Vergleich der Intra-Assay-Variationskoeffizienten (vgl. Tab. 2 und 3) von CPBA und EIA zeigen sich vergleichbar befriedigende Ergebnisse. Im niedrigen Konzentrationsbereich scheint der Merckotest®-EMIT®-tfg dem Tetralute®-Test in der Präzision leicht überlegen, während es bei hohen T_4-Konzentrationen möglicherweise umgekehrt ist. Bei beiden Tests konnten geringfügige systematische Unterschiede zwischen erster und zweiter Messung festgestellt werden (vgl. 4.3.1).

Autoren (12, 30, 40, 44), die ebenfalls den Variationskoeffizienten in der Serie beim EMIT®-Verfahren berechnet haben, kamen stets zu guten bis sehr guten Ergebnissen (siehe Tab. 11). Bei früheren Untersuchungen in unserer Abteilung wurden mit dem Tetralute®-Test ebenfalls Intra-Assay-Variationskoeffizienten um 3,5 % ermittelt (45).

Bei den Angaben zum Inter-Assay-Variationskoeffizienten muß zwischen der Varianz von Charge zu Charge, zwischen den Lieferungen derselben Chargennummer und schließlich von Testlauf zu Testlauf unterschieden werden. Beim EIA lagen zwei Chargen mit je zwei Lieferungen und eine Charge mit nur einer Lieferung vor. Eine Lieferung ergab durchschnittlich 14 Testläufe. Bei den zum Vergleich stehenden CPBA-Bestimmungen wurden mit einer Charge zwischen 1 und 7 Testläufe durchgeführt.

Dem Sachverhalt, daß ein Unterschied zwischen der Mittelung des VK sämtlicher Testläufe und dem Mittelwert aus dem VK der einzelnen Lieferungen besteht, tragen die Tab. 4 und 5 über die Inter-Assay-Varianz Rechnung. Es zeigt sich, daß, hervorgerufen durch systematische Abweichungen zwischen den einzelnen Chargen (vgl. 4.2.2), der Variationskoeffizient bei Zusammenfassung der Chargen stark ansteigt. Beim EIA beträgt der Variationskoeffizient z.B. beim Poolserum über die Testläufe aller Chargen 6,1 %, während der Variationskoeffizient gemittelt über die Testläufe mit den einzelnen Chargen 3,7 % beträgt. Ähnliche Ergebnisse finden sich bei den Kontrollseren. Auch bei der CPBA bestehen systematische Abweichungen zwischen den Chargen, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei dem EIA. Trotz dieser "Chargensprünge" zeigt der EIA bei den Inter-Assay-Variationskoeffizienten bessere Werte in allen Konzentrationsbereichen als die CPBA (vgl. Tab. 4). Tab. 12 zeigt den Vergleich eigener Werte mit Werten anderer Autoren (12, 30, 40, 44).

Die Inter-Assay-Variationskoeffizienten im höheren Konzentrationsbereich sind im allgemeinen kleiner als in niederen (vgl. Tab. 5).

Die von uns zur Prüfung der Präzision mitgeführten Kontrollseren liegen in ihren Mittelwerten bzw. Normbereichen bei CPBA und EIA im allgemeinen niedriger als die vom Hersteller angegebenen (vgl. Tab. 6). Beim Vergleich der 2s-Bereiche (vgl. Abb. 4) fällt die deutlich geringere Streubreite des EIA bei Kontrollserum 2 auf.

Die Korrelation zwischen den beiden von uns geprüften T_4-Tests ist gut (siehe Abb. 8). Besonders wenn alle Patientengruppen gemeinsam betrachtet werden, kommt man auf eine enge Korrelation ($r = 0,95$). Vergleiche zwischen EIA und CPBA sind aus der Literatur nicht zu entnehmen. Einige Autoren (12, 13, 30, 40, 44) fanden eine relativ enge Korrelation zwischen EIA und RIA bei der T_4-Bestimmung.

Methode	Autor	Gerät (Test)	n	$\bar{x}$ (µg/dl)	VK%
CPBA	Eigene Werte	Gamma-Zähler (Tetralute^R)	20	7,2	1,9 %
EIA "EMIT"-Technik		ABA 100 (Merckotest^R)	64	7,8	3,4 %
	Finley (12)	ABA 100	40	7,3	5,1 %
	Vogt (44)	ABA 100 (Merckotest^R)	10	7,4	3,9 %
		LKB	10	6,2	2,3 %
	Riesen (30)	Kem-O-Mat	17	8,6	3,0 %
	Syva (40) *)	ABA 100	18	8,0	4,6 %

Tab. 11: Vergleich der Intra-Assay-Variationskoeffizienten im Konzentrationsbereich zwischen 6 und 8 µg/dl

Methode	Autor	Gerät (Test)	n	$\bar{x}$ (µg/dl)	VK%
CPBA	Eigene Werte	Gamma-Zähler (Tetralute^R)	20	7,2	6,6 %
EIA "EMIT" Technik		ABA 100 (Merckotest^R)	65	7,8	6,3 %
	Finley (12)	ABA 100	20	7,1	5,9 %
	Vogt (44)	ABA 100 (Merckotest^R)	10	5,9	4,8 %
		LKB	10	6,1	5,9 %
	Riesen (30)	Kem-O-Mat	10	8,6	7,0 %
	Syva (40) *)	ABA 100	16 je 5mal	$\approx$ 8,0	6,1 %

Tab. 12: Vergleich der Inter-Assay-Variationskoeffizienten im Konzentrationsbereich zwischen 6 und 8 µg/dl (für Einzelbestimmungen)

*) Die Angaben der Firma Syva wurden aus den Variationskoeffizienten von 5 Referenz-Labors gemittelt.

6.7 Diagnostische Treffsicherheit und Normbereiche

In der diagnostischen Treffsicherheit sind die untersuchten Tests vergleichbar gut (vgl. Abb. 6 u. 7). Die Gruppe der euthyreoten Patienten zeigt beim EIA eine annähernd normale Verteilung, während sie bei der CPBA eher lognormal erscheint. Bei dem EIA werden 9 Patienten gegenüber 5 bei der CPBA (von 175) nicht als euthyreot erkannt. Beide Normbereiche liegen erheblich unter den von den Herstellern und anderen Autoren (12, 13, 30) angegebenen Werten (vgl. Tab. 9). Dies ist darauf zurückzuführen, daß die T_4-Werte im Jodmangelgebiet des Würzburger Raumes im Mittel niedriger liegen.

Bei der Abgrenzung der Hyperthyreosen gegenüber dem Normbereich zeigen die Tests keinen wesentlichen Unterschied. Beide weisen erwartungsgemäß normale T_4-Werte bei vier sogenannten T_3-Hyperthyreosen auf.

Bei den Hypothyreosen wird bei der CPBA oft die Grenze der Nachweisbarkeit unterschritten. Von den 60 Patienten mit einer Unterfunktion werden mit beiden Testarten je 3 Patienten falsch negativ diagnostiziert.

Die meisten euthyreoten Patientinnen unter Einnahme oraler Kontrazeptiva liegen bei beiden Testarten noch im jeweiligen Normbereich, die Mittelwerte sind jedoch aufgrund der Eiweißverschiebung (vgl. 6.3) leicht erhöht. Wesentlich höher hingegen sind die Mittelwerte bei Patientinnen in der Schwangerschaft. Hier liegen die festgestellten T_4-Konzentrationen meist im hyperthyreoten Bereich. Um die zwei letztgenannten Gruppen sicher zu diagnostizieren, muß der freie Thyroxin-Index (FT_4I) gebildet werden, der eine Beurteilung der Schilddrüsenfunktionslage bei verändertem TBG-Gehalt des Blutes ermöglicht (29).

Die Gruppen der Patienten nach erfolgter Strumaresektion decken sich weitgehend mit den Normbereichen.

Bei den Patienten mit einem autonomen Adenom der Schilddrüse streuen die Testwerte aus bekannter Ursache (7, 8) bis in die hyperthyreoten Bereiche. Die Schilddrüsenfunktion ist hier von der sehr unterschiedlichen Hormonproduktion des Adenoms abhängig.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der homogene Enzym-Immuno-Assay (Merckotest®-EMIT®-tfg) zur T_4-Bestimmung in methodischer und klinischer Hinsicht geprüft und mit einem routinemäßig verwendeten CPBA-Test (Tetralute®) verglichen.

Hierzu untersuchten wir insgesamt 724 Patientenseren, wovon 181 beim EIA für den Intra-Assay doppelt bestimmt wurden. Zusätzlich erfolgten mit dem EIA 179 und der CPBA 77 Doppelbestimmungen von Kontrollseren mit drei unterschiedlichen T_4-Konzentrationen.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1) Die Intra-Assay-Varianz liegt im mittleren Konzentrationsbereich beim EIA zwischen 3,4 % und 5,9 %; sie ist durch systematische Abweichungen etwas schlechter als bei der CPBA.

2) Die Inter-Assay-Varianz für Einzelbestimmungen beträgt bei einem Poolserum von 7,5 µg/dl für den EIA 4,5 % und für die CPBA 6,3 %. Hier zeigt der EIA die bessere Präzision.

3) Beim Wechsel der Charge kommt es bei beiden Tests zu systematischen Abweichungen, die beim EIA ausgeprägter sind. Dies wird jedoch durch die bessere Präzision des EIA beim Inter-Assay ausgeglichen.

4) In der diagnostischen Trennschärfe sind beide Tests vergleichbar gut. Sie zeigen eine enge Korrelation (bei euthyreoten Patienten $r = 0,95$).

5) Der EIA zeigt bei Großserien in der Handhabung Vorteile, die auch zu einer wesentlichen Zeitersparnis führen. Die Kosten bei Einfachbestimmungen liegen um ein Drittel günstiger als bei der CPBA.

6) Die enzymimmunologische Technik bietet den Vorteil, keine radioaktiven Isotope verwenden zu müssen. Somit entfallen die zur Einhaltung der Strahlenschutzvorschriften notwendigen Maßnahmen.

Abschließend kann festgestellt werden, daß der EIA eine klare Alternative zur CPBA darstellt. Die Verbreitung des EIA ist z.Zt. noch eingeschränkt, da mit der gleichen Technik keine weiteren In-vitro-Tests für die Schilddrüsen-Funktionsdiagnostik zur Verfügung stehen.

An dieser Stelle möchte ich dem Referenten,

Herrn Professor Dr.med. W. Börner,

für die freundliche Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit danken.

Herrn Akademischen Direktor,
Diplom-Physiker E. Moll

gilt mein besonderer Dank und meine Anerkennung für seine wertvolle Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 AALBERSE, R.C.:
Quantitative Fluoroimmunoassay.
Clin. chim. Acta 48 (1973) 109

2 AVRAMEAS, S., GUILBERT, B.:
Enzym-immuno-assay for the Measurement of Antigens Using Peroxidase Conjugates.
Biochimie 54 (1972) 837

3 BÖRNER, W., MOLL, E., BAYER, H.:
Schilddrüsenszintigraphie mit 99m-Tc.
Med. Welt (N.F.) (1965) 1151

4 BÖRNER, W., MOLL, E., RAUH, E., NAUMANN, P.:
Ein 132-J-99mTc Zweiphasenkurztest.
Schilddrüsendiagnostik mit herabgesetzter Strahlenbelastung.
Vortrag 6. Jtgg. Ges. f. Nuklearmedizin, Wiesbaden 1968
In: Radioisotope in Pharmakokinetik und klinischer Biochemie,
Schattauer, Stuttgart - New York (1970) 637

5 BÖRNER, W., LAUTSCH, M., MOLL, E., RAUH, E.:
Verbesserung der klinischen Hyperthyreose-Diagnostik mit Hilfe eines einfachen Punktesystems.
Dtsch. Med. Wschr. 45 (1968) 2173

6 BÖRNER, W., LAUTSCH, M., MOLL, E., RAUH, E.:
Ein einfaches Punktesystem zur Verbesserung der klinischen Hyperthyreose-Diagnostik.
Med. Welt 19 (N.F.) (1968) 2463

7 BÖRNER, W., MOLL, E., RAUH, E., NAUMANN, P., RUPPERT, G.:
Das Erscheinungsbild des Toxischen Adenoms in Abhängigkeit vom Alter.
Vortrag 8. Jtgg. Ges. f. Nuklearmedizin, Zürich 1969
In: Ergebnisse der klinischen Nuklearmedizin,
Schattauer, Stuttgart - New York (1971)

8 BÖRNER, W., MOLL, E., RAUH, E., POHNER, A., GREEN, S., RUPPERT, G.:
Diagnose des Autonomen Adenoms der Schilddrüse.
Dtsch. med. Wschr. 96 (1971) 1707

9 CHOPRA, I.J., SOLOMON, D.H., HO, R.S.:
A Radioimmunoassay of Thyroxine.
J. clin. Endocr. 33 (5) (1971) 865

10 EGGSTEIN, M., LIEBISCH, H.M., STEIN, W.:
Der Enzym-Immuno-Assay.
Diagnostik u. Intensivtherapie 8 (1977) 74

11 ENGVALL, E., PERLMANN, P.:
Enzym-linked Immunosorbent Assay (Elisa)
Quantitative Assay of Immunoglobuline G.
Immunochemistry 8 (1971) 871

12 FINLEY, P.R., WILLIAMS, J.:
Evaluation of Homogeneous Enzym-immuno-assay of Serum Thyroxine with Bichromatic Analysis.
Clin. Chem. 24 (1) (1978) 165

13 GALEN, R.S., FORMAN, D.:
Enzym-Immunoassay of Serum Thyroxine with "Auto Chemist" Multichannel Analyzer.
Clin. Chem. 32 (1) (1977) 119

14 HAIMOVICH, J., HURWITZ, E., NOVIK, N., SELA, M.:
Use of Proteinbacteriophage Conjugates for Detection and Quantitation of Proteins.
Biochim. biophys. Acta 207 (1970) 125

15 HAECKEL, R., OELLRICH, M.:
Enzymimmunotests für die Routine-Diagnostik.
Lab. Med. 1 (1977) 121

16 HÖHN, W.:
Methodische und klinische Prüfung zweier T_4-Tests zur Thyroxinbestimmung im Serum.
Dissertation, Würzburg 1974

17 JAKLITSCH, A.P., SCHNEIDER, R.S., JOHANNES, R.J. et al.:
Homogeneous Enzym-immuno-assay for T-4 in Serum.
Clin. Chem. 22 (1976) 1185 Abstract

18 KLEINHAMMER, G., LENZ, H., LINKE, R., STAELER, F.:
Enzymimmunologische Bestimmung von T_4 und T_3 in Antikörper-beschichteten Gläschen.
In: Enzym-Immuno-Assay,
Thieme, Stuttgart 1978

19 LEUTE, R., ULLMAN, E., GOLDSTEIN, A., HERZENBERG, L.:
Spin Immunoassay Technique for Determination of Morphin.
Nature New Biol. 236 (1972) 93

20 LEUTE, R.K., ORTH, H.D.:
Prinzip und Anwendung des homogenen Enzym-Immuno-Assay.
In: Enzym-Immuno-Assay,
Thieme, Stuttgart 1978

21 MERCK:
Arbeitsanleitung des Merckotest®- EMIT®- tfg.
Firma E. Merck, 61 Darmstadt, BRD

22 MIEDEMA, K., BOELHOUWER, J., OTTEN, J.W.:
Determination of Proteins and Hormones in Serum by an Immunoassay Using Antigene-Enzyme Conjugates.
Clin. chim. Acta 40 (1972) 187

23 MILES, L.E.M., HALES, C.N.:
Immunoenzymometric Assay.
Nature (Lond.) (1970) 219

24 MITSUMA, T., COLUCCI, J., SHENKMAN, L., HOLLANDER, C.S.:
Rapid Simultaneous Radioimmunoassay for Triiodothyronine and Thyroxine in Unextracted Serum.
Biochem. biophys. Res. Commun. 46 (6) (1972) 2107

25 MURPHY, B.P., PATTEE, C.J.:
Determination of Thyroxine Utilizing the Property of Protein Binding.
J. clin. Endocr. 24 (1964) 187

26 MURPHY, B.P., JACHAN, C.:
The Determinations of Thyroxine by Competitive Protein-Binding-Analysis Employing an Anion-Exchange-Resin and Radiothyroxine.
J. Lab. clin. Med. 66 (1965) 161

27 MURPHY, B.P., PATTEE, C.J., GOLD, A.:
Clinical Evaluation of a New Method for Determination of Serum Thyroxine.
J. clin. Endocr. 26 (1966) 247

28 NAKAJIMA, H., KURAMOCHI, M., HORIGUCHI, T., KUBO, S.:
A New and Simple Method for the Determination of Serum Thyroxine.
J. clin. Endocr. 26 (1966) 99

29 PFANNENSTIEL, P.:
Diagnostik von Schilddrüsen-Erkrankungen.
Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach-Steinberg 1974

30 RIESEN, W.F., MUACEVIC, B., JAGGI, M.:
Radioimmunoassay and Automated Enzyme Immunoassay for the Determination of Thyroxine.
J. clin. Chem. clin. Biochem. 16 (1978) 387

31 ROOTWELT, K.:
The Influence of Fatty Acids on Serum Thyroxine Determination by Competitive Protein Binding Radioassay.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 35 (7) (1975) 649

32 ROOTWELT, K.:
Specifity of Competitive Protein Binding Radioassay of Serum Thyroxine Determination.
In: Excerpta Medica 8 (1975)
7. International Thyroid Conference,
Boston Mass. Juni 1975

33 ROWLEY, G.L., RUBENSTEIN, K.E., HUISJEN, J., ULLMANN, E.F.:
Mechanism by which Antibodies Inhibit Hapten-Malat-Dehydrogenase Conjugates.
J. biol. Chem. 250 (1975) 3759

34 RUBENSTEIN, K.E., SCHNEIDER, R.S., ULLMANN, E.F.:
"Homogeneous" Enzym-immuno-assay.
A New Immunochemical Technique.
Biochem. biophys. Res. Commun. 47 (1972) 846

35 RUPPERT, G., WAGNER, K., MOLL, E., REINERS, CHR., SEYBOLD, K., BÖRNER, W.:
Vergleich von RIA und CPBA zur Thyroxinbestimmung im Serum.
In: Schilddrüse 1975,
Thieme, Stuttgart (1977) 363

36 RUPPERT, G.:
Seralute® - T_4.
Persönliche Mitteilung (1977)

37 SANDEL, P., VOGT, W.:
Gegenüberstellung verschiedener mathematischer Verfahren zur Ermittlung enzymimmunologischer Ergebniswerte auf Kleinrechnern.
G-I-T Fachz. Lab. 21 (1977) 295

38 SCHARPE, S.L., COOREMAN, W.M., BLOMME, W.J., LAEKMAN, G.M.:
Quantitative Enzyme-immuno-assay.
Current Status, Clin. Chem. 22 (6) (1976) 733

39 SCHUURS, A.H.W.M., van WEEMAN, B.K.:
Prinzip des heterogenen Enzym-Immuno-Assay.
In: Enzym-Immuno-Assay,
Thieme, Stuttgart 1978

40 SYVA:
Clinical Study No. 37.
Report by: J.Y. Chang, K.P. Mc Carty, R.J. Bastiani
Syva, Palo Alto, California (1977)

41 ULLMANN, E.F., BLAKEMORE, J., LEUTE, R.K. et al.:
Homogeneous Enzym-immuno-assay for Thyroxine.
Clin. Chem. 21 (1975) 1011

42 VOGT, W., TAUSCH, A., EBENROTH, S., DURMEYER, E.:
Bestimmung des Gesamtthyroxins mit dem homogenen Enzym-Immuno-Assay. Vergleich der manuellen und automatisierten enzymimmunologischen Methode mit einem Radioimmunoassay.
Frenius Z. Anal. Chem. 290 (1978) 97

43 VOGT, W.:
Enzym-Immuno-Assay: Grundlagen Prakt. Anwendung.
Thieme, Stuttgart (1978)

44 VOGT, W., TAUSCH, A.:
Die Bestimmung des Gesamt-Thyroxins mit dem homogenen Enzym-Immuno-Assay.
In: Praktische Anwendung des Enzym-Immuno-Assays in klinischer Chemie und Serologie,
Thieme, Stuttgart (1979) 31

45 WAGNER, K.:
Bestimmung von Thyroxin im Serum mittels Radioimmunoassay und kompetitiver Eiweißbindungsanalyse (Simultanuntersuchung mit 4 Testbestekken).
Dissertation, Würzburg 1978

46 WEEMAN, B.L. van, SCHUURS, A.H.W.M.:
Immunoassay Using Antigen-enzym Conjugates.
FEBS Letters 15 (1971) 232

47 WISDOM, G.B.:
Enzym-Immuno-Assay.
Clin. Chem. 22 (1976) 1243

48 YALOW, R.S., BERSON, S.A.:
Assay of Plasmainsulin in Human Subjects by Immunological Methods.
Nature, 184 (1959) 1648

L E B E N S L A U F

Am 26. August 1952 wurde ich als Sohn des selbständigen Bäckermeisters Charles Weidmann und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Müller, in Offenbach am Main geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Grundschule in Offenbach trat ich 1963 in das Förderstufensystem ein. Zwei Jahre später wurde ich in die Realschule eingestuft. Für zwei Kurzschuljahre besuchte ich die Goethe-Realschule und wechselte zum neunten Schuljahr auf die Eichendorff-Hauptschule. 1967 beendete ich meine Schulzeit mit einem Hauptschulabschluß.

Im Herbst 1967 begann ich eine Bäckerlehre im elterlichen Betrieb und legte nach drei Jahren die Gesellenprüfung ab. Von 1970 bis 1972 erlernte ich den Beruf des Konditors in Frankfurt. Danach arbeitete ich für zwei Jahre in meinen erlernten Berufen.

Ab Januar 1971 besuchte ich das Abendgymnasium für Berufstätige in Offenbach, an dem ich 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Mit dem Wintersemester 1974/75 immatrikulierte ich mich an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg zum Medizinstudium. Die ärztliche Vorprüfung legte ich 1976, den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1977 und den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1979 ab. Das praktische Jahr absolvierte ich am Landeskrankenhaus Coburg in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Kinderheilkunde.

Den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand ich am 5. November 1980.

Hans-Werner Weidmann